

PCT COOPERATION TREATY

PCT/IB/331 (July 1992)

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 06 May 1999 (06.05.99)	
International application No. PCT/EP98/05127	Applicant's or agent's file reference 980645wo Me
International filing date (day/month/year) 11 August 1998 (11.08.98)	Priority date (day/month/year) 11 August 1997 (11.08.97)
Applicant STOFFEL, Wilhelm et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
06 March 1999 (06.03.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer <p style="text-align: center;">Nicola Wolff</p>
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 09 NOV 1999

WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 980645wo Me/kk	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05127	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/08/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 11/08/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/55		
Anmelder MEMOREC STOFFEL GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 06/03/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 04. 11. 99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Heimann-Pohl, B Tel. Nr. +49 89 2399 8713 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05127

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-25 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-21 eingegangen am 26/08/1999 mit Schreiben vom 24/08/1999

Zeichnungen, Blätter:

1/12-12/12 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:

- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
- ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.

2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das

maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

☐ die gesamte internationale Anmeldung.

☒ Ansprüche Nr. 8.

Begründung:

☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 8 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):

siehe Beiblatt

☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-7, 9-21 Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-7,9-21 Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-7,9-15,18-21 Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

- 1). Die vorliegende Anmeldung betrifft eukaryontische (humane und murine) neutrale Sphingomyelinase (nSMase) mit einem Molekulargewicht von 47,6 bzw. 47.5 kDa, die dafür codierenden Nukleinsäuren, Antikörper gegen nSMase und Verwendung der nSMase sowie transgene Zellen und Tiere.

- 2). Stand der Technik

D1 (J. Biol. Chem., Bd. 264, Nr. 21, 1989, Seiten 12554-12561) beschreibt eine nSMase aus menschlichem Urin, mit einem Molekulargewicht von 92,000 und einem pH Optimum von 7.4. Diese nSMase wurde 440-fach gereinigt und monospezifische polyklonale Antikörper gegen diese nSMase wurden erhalten. D1 offenbart weder die Aminosäuresequenz dieser nSMase noch die dafür codierende Nukleinsäuresequenz.

- 3). Neuheit

Der Gegenstand der Ansprüche 1-7 und 9-21 scheint gegenüber der Lehre von D1 neu zu sein.

- 4). Erfinderische Tätigkeit

Da das Protein aus D1 mit einem Molekulargewicht von 92 kDa sich offensichtlich von den nSMasen der vorliegenden Anmeldung unterscheidet, können die nSMasen der vorliegenden Anmeldung nicht in naheliegender Weise von der nSMase aus D1 abgeleitet werden. Der Gegenstand der Ansprüche 1-7 und 9-21 scheint somit auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen.

- 5). Klarheit

Die Fragmente des Anspruchs 8 sind nicht technisch definiert oder funktionell limitiert. Es kann bei so kurzen Fragmenten von z.B. 7 Nukleotiden nicht ausgeschlossen werden, daß derartige Fragmente im Stand der Technik bereits bekannt sind. Der Schutzzumfang eines Anspruchs mit einem derartigen Wortlaut

ist daher unklar (Art. 6 PCT).

Anspruch 8 kann daher im Hinblick auf Neuheit und erfinderische Tätigkeit nicht geprüft werden

6). Gewerbliche Anwendbarkeit

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 16 und 17 gewerblich anwendbar sind, enthält der PCT keine eindeutigen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

7). Priorität

Falls die beanspruchte Priorität der vorliegenden Anmeldung nicht gültig sein sollte, was nicht überprüft werden konnte, würden weitere Dokumente (WO A 98 28445 und Proc.Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 95, Nr. 7, 1998, Seiten 3638-3643) neuheitsschädlich relevant.

Patentansprüche

1. Eukaryontische neutrale Sphingomyelinase mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 1 oder Seq. ID. Nr. 2 sowie Varianten der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase mit der Seq. ID. Nr. 1 oder mit der Seq. ID. Nr. 2, die hinsichtlich der biologischen und/oder immunologischen Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase entsprechen.
2. Eukaryontische neutrale Sphingomyelinase, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine C- oder N-terminale verkürzte Variante handelt.
3. Nukleinsäure kodierend für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase nach Anspruch 1 oder 2.
4. Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 3 oder Seq. ID. Nr. 4.
5. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 3 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um DNA, RNA, PNA oder nukleaseresistente Analoga, mRNA, cDNA oder genomische DNA handelt.
6. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um das Gen für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase handelt und neben codierenden Bereich (Exons) nicht codierende Bereiche (Introns) aufweist, insbesondere ein Gen mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 5 und Seq. ID. Nr. 6.
7. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zur Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 3 bis 6 ist.

8. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Derivate, Fragmente mit mehr als sechs Nucleotiden oder Varianten der Nukleinsäuren handelt.
9. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 oder eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 3 bis 8 gerichtet sind.
10. Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß sie neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 1 oder 2 überexprimiert.
11. Zelllinie gemäß Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine eukaryontische neutrale Sphingomyelinase exprimierende Zelllinie handelt, die auf den Zelllinien U937, HEK 293 oder Jurkat beruht.
12. Transgenes Säugetier mit Überexpression (gain of function) oder Gendefizienz oder Gendefekt (loss of function) für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 1 oder 2.
13. Transgenes Säugetier gemäß Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß es ein Nagetier ist.
14. Arzneimittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 3 bis 8 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
15. Diagnostikmittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der

Ansprüche 3 bis 8 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.

16. Verwendung der Arzneimittel gemäß Anspruch 14 oder der Diagnostikmittel gemäß Anspruch 15 zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Über- oder Unterexpression und/oder einer erhöhten oder verminderten Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase und/oder auf Störungen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und/oder Apoptose beruhen.
17. Verwendung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen um Entzündungsprozesse, Zellwachstumstörungen, Krebs und/oder Stoffwechselstörungen wie Störungen der Cholesterinhomöostase (Arteriosklerose) handelt.
18. Verfahren zum Screening von Wirkstoffen dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Expression oder Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase in Zelllinien gemäß Anspruch 10 bei Zugabe von mindestens einer möglichen pharmazeutisch wirksamen Substanz gemessen wird.
19. Verwendung der Zelllinie gemäß Anspruch 10 zur Entwicklung und Prüfung von pharmazeutischen Leitstrukturen.
20. Verfahren zur Herstellung der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 durch chemische Peptidsynthese oder durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen, insbesondere in eukaryontischen Expressionssystemen.

21. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 3 bis 8 durch chemische Synthese oder durch Vervielfältigung in gentechnisch veränderten Organismen.

GEÄNDERTES BLATT

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 980645wo Me/kk	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/05127	International filing date (day/month/year) 11 August 1998 (11.08.1998)	Priority date (day/month/year) 11 August 1997 (11.08.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/55, 9/16, 5/10, C07K 16/40, G01N 33/50, A61K 38/43, A01K 67/027		
Applicant MEMOREC STOFFEL GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>4</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input checked="" type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06 March 1999 (06.03.1999)	Date of completion of this report 04 November 1999 (04.11.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/05127

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-25, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-21, filed with the letter of 24 August 1999 (24.08.1999),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/12 - 12/12, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/05127

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

See Supplemental Box

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/05127

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 8

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 8
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

See Supplemental Box

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05127

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7, 9-21	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-7, 9-21	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7, 9-15, 18-21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

See supplemental sheet

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05127

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

See supplemental sheet

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.3., III, V.2., VIII

1). The present application concerns eukaryotic (human and murine) neutral sphingomyelinase (nSMase) with a molecular weight of 47.6 or 47.5 kDa, the nucleic acids that code therefor, antibodies against nSMase and the use of nSMase as well as transgenic cells and animals.

2). Prior art

D1 (J. Biol. Chem., Vol. 264, No. 21, 1989, pages 12554-12561) describes an nSMase from human urine with a molecular weight of 92 000 and a pH optimum of 7.4. This nSMase was purified 440 times and monospecific polyclonal antibodies against this nSMase were obtained. D1 discloses neither the amino acid sequence of said nSMase nor the nucleic acid sequence that codes therefor.

3). Novelty

The subjects of Claims 1-7 and 9-21 appear to be novel over the teaching of D1.

4). Inventive step

Since the protein of D1 with a molecular weight of 92 kDa clearly differs from the nSMases of the present application, the nSMases of the present application cannot be derived in an obvious manner from the nSMase of D1. The subjects of Claims 1-7 and 9-21 therefore appear to involve an inventive

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.3., III, V.2., VIII

step.

5). Clarity

The fragments of Claim 8 are not technically defined or functionally limited. For such short fragments of, for example, 7 nucleotides, it cannot be ruled out that such fragments are already known from the prior art. The scope of protection of a claim worded in such a way is therefore unclear (PCT Article 6).

Claim 8 therefore cannot be examined in respect of novelty and inventive step.

6). Industrial applicability

The PCT does not contain uniform criteria for assessing the industrial applicability of the present Claims 16 and 17. Patentability can also depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical treatment.

7). Priority

If the claimed priority of the present application, which cannot be checked, should prove to be

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

national application No.
PCT/EP 98/05127

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.3., III, V.2., VIII

incorrect, other documents would prejudice the novelty of the application (WO-A-98/28445 and Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 95, No. 7, 1998, pages 3638-3643).



.

.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05127

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although the claim(s) 16 and 17 relate(s) to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/05127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828445 A	02-07-1998	AU 5809398 A	17-07-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/05127

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KOSTELLOW A ET AL: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE, ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS"</p> <p>FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 30 April 1996, page A1253 XP000644454 see abstract</p>	3
A	<p>CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity."</p> <p>J. BIOL. CHEM., vol. 272, no. 11, 14 March 1997, XP002087488 see abstract</p>	14-17
A	<p>DATABASE GENBANK Accession No. AA412649, 18 May 1997 HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST." XP002087490 compare with amino acids 247-394 in sequence ID 1</p>	1-24
P,X	<p>TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?"</p> <p>PRC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 95, no. 7, 31 March 1998, pages 3638-3643, XP002087489 see the whole document</p>	1-11, 20-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. onal Application No
PCT/EP 98/05127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/55 C12N9/16 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/50
A61K38/43 A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K A01K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., vol. 264, no. 21, 25 July 1989, pages 12554-12561, XP002087487 see the whole document	1-3,5-7, 9,21,24
A		4,8, 10-20, 22,23
P,X	WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2 July 1998 see abstract see figures 1,2 see claims 1-30	1-3,5-7, 9,14-19, 21,24
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 1998

Date of mailing of the international search report

29/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Galli, I

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/55, 9/16, 5/10, C07K 16/40, G01N 33/50, A61K 38/43, A01K 67/027		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/07855 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Februar 1999 (18.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05127 (22) Internationales Anmeldedatum: 11. August 1998 (11.08.98) (30) Prioritätsdaten: 197 34 764.9 11. August 1997 (11.08.97) DE 197 58 501.9 15. Oktober 1997 (15.10.97) DE 60/078,386 18. März 1998 (18.03.98) US (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MEM- OREC STOFFEL GMBH [DE/DE]; Stöckheimer Weg 1, D-50829 Köln (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STOFFEL, Wilhelm [DE/DE]; Kornelimünsterstrasse 14, D-50933 Köln (DE). HOFMANN, Kay [DE/DE]; Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften, Institut für Biochemie, Med. Fak., Joseph-Stelzmann-Strasse 52, D-50931 Köln (DE). TOMIUK, Stephan [DE/DE]; Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften, Institut für Biochemie, Med. Fak., Joseph-Stelzmann-Strasse 52, D-50931 Köln (DE). (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	

(54) Title: NEUTRAL SPHINGOMYELINASE

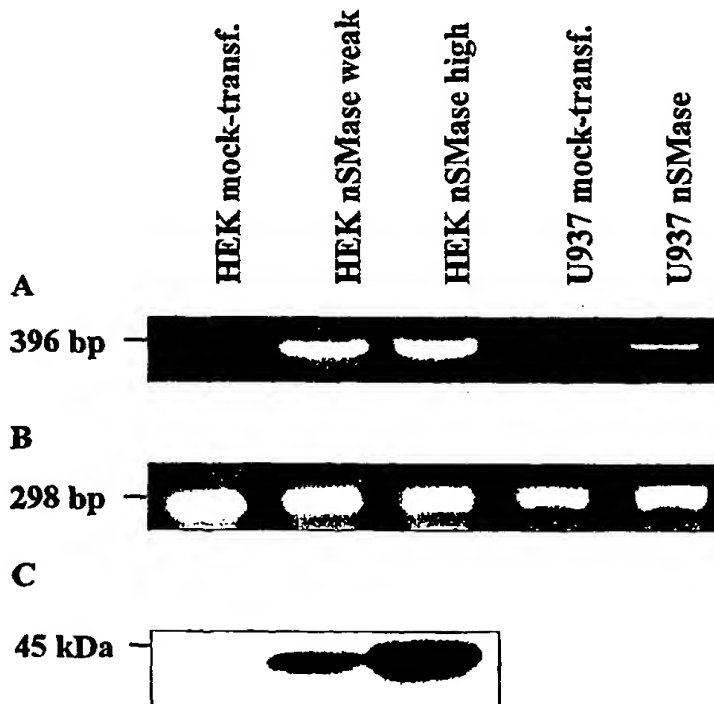
(54) Bezeichnung: NEUTRALE SPHINGOMYELINASE

(57) Abstract

The invention relates to eukaryotic neutral sphingomyelinase (nSMase) and the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eukaryontische neutrale Sphingomyelinase (nSMase) und seine Anwendung.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Neutrale Sphingomyelinase

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase codieren, und ihre Anwendung.

Sphingomyelin ist eine wesentliche Komponente von Plasmamembranen. Der Abbau des Sphingomyelins gibt eine Vielzahl von Substanzen, die potentielle second messenger Eigenschaften haben, z.B. Ceramid, Sphingosin, Sphingosin-1-phosphat. Es sind zwei sphingomyelinspaltende Enzymaktivitäten bekannt, zum einen die der lysosomalen sauren Sphingomyelinase und zum anderen die der plasmamembran-gebundenen neutralen Sphingomyelinase.

Die bakterielle neutrale Sphingomyelinase ist ein sezerniertes, lösliches Protein.

Durch die vorliegende Erfindung werden erstmals Nukleinsäuren, codierend für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase, verfügbar gemacht. Die eukaryontische neutrale Sphingomyelinase (nSMase) ist dadurch charakterisiert, daß sie Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin spaltet und die Aktivität von der Zugabe von Magnesiumionen abhängig ist. Es handelt sich um ein membrangebundenes Enzym. Die maximale Aktivität wird im neutralen pH-Bereich erzielt.

Figur 1 zeigt die Gensequenz der humanen neutralen Sphingomyelinase.

Figur 2 zeigt die Gensequenz der murinen neutralen Sphingomyelinase.

Figur 3 zeigt die Ergebnisse von Northern- und Westernblots nSMase-überexprimierender Zelllinien.

Figur 4 zeigt die Strategie zur Erzeugung von murinen Knockout-Mutanten. Die Buchstaben symbolisieren Restriktionsschnittstellen.

Figur 5 zeigt Konstrukte zur Gewinnung transgener Mausmutanten.

Bevorzugt handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Nukleinsäure um eine Nukleinsäure, die für die neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers codiert. In besonders bevorzugter Weise handelt es sich dabei um die humane und murine neutrale Sphingomyelinase. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen sind als Seq. ID. Nr. 3 und Seq. ID. Nr. 4 offenbart.

Teile der Nukleinsäuresequenzen stimmen mit der EST-Sequenzen AA028477 und AA013912 (murin) und W32352 und AA056024 (human) überein.

Bei Kenntnis der Aminosäure- und Nukleinsäurestruktur der humanen und murinen neutralen Sphingomyelinase kann der Fachmann unter Berücksichtigung der hohen Homologie zwischen der humanen und murinen nSMase die entsprechenden Nukleinsäuren und Proteine aus anderen Eukaryonten leicht auffinden. Dazu kann er zum einen kreuzreagierende Antikörper für eine spezifische affinitätschromatographische Aufreinigung einsetzen, oder er kann auf der Grundlage der Nukleinsäuresequenz Oligonukleotidprimer synthetisieren und die gesuchten Nukleinsäuren mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion in einer cDNA-Bank des Eukaryonten amplifizieren. Die entsprechende cDNA-Bank kann durch Isolierung von mRNA aus einer Gewebeprobe und anschließende Reverse-Transkription in an sich bekannter Weise erhalten werden. Aus der Nukleinsäuresequenz kann mit Hilfe des genetischen Codes die Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Alternativ ist es hierzu auch möglich, homologe Sequenzen in EST (Expressed Sequence Tags)-Datenbanken zu suchen und zu kombinieren.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eignen sich zur Expression der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase in pro- oder eukaryontischen Systeme. Darüber hinaus sind sie auch zur Expression der nSMase in vivo im Sinne einer Gentherapie oder insbesondere in Form von Fragmenten auch in komplementärer Struktur als Antisense-Nukleotide zur Verringerung der Expression der nSMase geeignet.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können durch chemische Synthese oder durch Vervielfältigung in gentechnisch veränderten Organismen nach dem Fachmann an sich bekannten Verfahren hergestellt werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die durch die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren erhältliche eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.

Die erfindungsgemäße nSMase läßt sich durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen herstellen. Insbesondere sind eukaryontische Expressionssysteme geeignet. Entsprechende eukaryontische Expressionssysteme sind dem Fachmann bekannt wie beispielsweise pRc/CMV (Firma Stratagene). Die Aufreinigung aus gentechnisch veränderten Organismen bietet, insbesondere im Falle der Überexpression, einen leichten und direkten Zugang zur erfindungsgemäßen nSMase und erlaubt darüber hinaus die Isolierung in größeren Mengen.

Bevorzugt handelt es sich um die eukaryontische neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers, insbesondere um humane oder murine neutrale Sphingomyelinase. Die Aminosäuresequenzen der humanen und murinen neutralen Sphingomyelinase sind als Seq. ID. Nr. 1 und 2 wiedergegeben.

Die Molekulargewichte der humanen bzw. murinen Sphingomyelinase beträgt 47,6 bzw. 47,5 kDa. Im Gegensatz zu den bakteriellen nSMasen enthalten die erfindungsgemäßen nSMasen von Säugetieren keine Signalsequenz am N-Terminus. Aufgrund der Hydrophobizi-

tätsanalyse kann davon ausgegangen werden, daß zwei benachbarte hydrophobe Membrandomänen am C-Terminus durch acht Aminosäuren getrennt sind. Es scheint sich daher um integrale Membranproteine zu handeln, deren katalytisch aktive Domäne zum Cytosol zeigt, während nur ein geringer Anteil der Enzyme Kontakt zur extrazellulären Umgebung hat. Dies ist im Gegensatz zu den bakteriellen nSMasen, bei denen es sich um sekretierte, lösliche Proteine handelt, ist aber in Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen zu den Eigenschaften der neutralen Sphingomyelinasen von Säugetieren. Die 1,7 kb mRNA der murinen nSMase wird gemäß Northern Blot Analyse in allen Geweben exprimiert. In Nieren, Hirn, Leber, Herz und Lunge zeigt der Northern Blot ein starkes Signal, während die Expression in der Milz gering zu sein scheint. Diese Messung war nicht in Übereinstimmung mit den gemessenen enzymatischen Aktivitäten der entsprechenden Gewebe. Dies spricht für eine posttranskriptionale Regulation der nSMase.

Das pH-Optimum der erfindungsgemäßen neutralen Sphingomyelinase liegt im Bereich von 6,5 bis 7,5 mit einem K_m -Wert für C18 Sphingomyelin im Bereich von $1,0$ bis $1,5 \times 10^{-5}$ M. Die Aktivität ist magnesiumionenabhängig, die Zugabe von EDTA führt zu einer Inhibierung der SMase-Aktivität, kann jedoch durch Zugabe von Mn^{2+} - oder Mg^{2+} -Ionen wiederhergestellt werden. Die Zugabe von 0,3 bis 0,5% Triton X-100 erhöht die Enzymaktivität. Die Aktivität ist unbeeinflusst durch Behandlung mit DTT oder 2-Mercaptoethanol, wohingegen die Zugabe von 20 mM Glutathion zur Inhibierung führte. Die Aktivität der nSMase ist nicht auf Sphingomyelin limitiert, auch das strukturell verwandte Phosphatidylcholin wurde mit etwa 3% Aktivität gespalten.

Weiterhin beansprucht werden Varianten der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase. Unter den Begriff "Varianten" fallen sowohl natürlich vorkommende allelische Variationen der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase sowie durch rekombinante DNA-Technologie (insbesondere durch in vitro Mutagenese mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden) und an-

- 5 -

schließende Expression erzeugte Proteine, die hinsichtlich ihrer biologischen und/oder immunologischen Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase entsprechen. Dabei können sowohl Aminosäuren deletiert, eingefügt oder konservativ ausgetauscht werden. Konservativer Austausch bedeutet, daß eine Aminosäure durch eine Aminosäure ersetzt wird, die ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufweist.

So sind beispielsweise folgende Aminosäuren austauschbar: Serin für/gegen Alanin, Alanin für/gegen Glycin, Methionin für/gegen Serin, Lysin für/gegen Arginin, Lysin für/gegen Serin.

Insbesondere umfaßt der Begriff Varianten auch N- und/oder C-terminale verkürzte Proteine sowie acetylierte, glykosylierte, amidierte und/oder phosphorylierte Derivate.

Die Aktivität der nSMase scheint zumindest zum Teil im C-terminalen Bereich zu liegen, da das Fragment 1 bis 282 der murinen nSMase bei Expression in HEK293 Zellen keine Erhöhung der Sphingomyelinase-Aktivität zeigte. C-terminale Fragmente der nSMase sind ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung. Auch Verbindungen, bei denen nSMase oder seine Varianten mit weiteren Molekülen wie Farbstoffe, Radionukliden oder Affinitätskomponenten gekoppelt sind, stellen erfindungsgemäße Varianten dar.

Beansprucht werden auch Nukleinsäuren, die für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase codieren bzw. komplementär zu diesen Nukleinsäuren sind. Bei den Nukleinsäuren kann es sich beispielsweise um DNA, RNA, PNA oder um nukleaseresistenter Analoga handeln. Nukleaseresistente Analoga sind insbesondere solche Verbindungen, in denen die Phosphodiesterbindung durch hydrolysestabile Verbindungen modifiziert sind, beispielsweise Phosphothioate, Methylphosphonate o.ä.

Für Antisensenukleotide sind insbesondere kurze Fragmente der Nukleinsäuren geeignet. Diese sollten aus Gründen der Spezifität bevorzugt mehr als 6, noch mehr bevorzugt mehr als 8 und am

meisten bevorzugt mehr als 12 Nukleotide aufweisen. Aus Gründen der Diffusion und der Kosten haben sie üblicherweise eine Länge von weniger als 30 Nukleotiden, bevorzugt 24 oder weniger und noch mehr bevorzugt 18 oder weniger Nukleotide.

Gegenstand der Erfindung sind auch Derivate von Nukleinsäuren, die für diagnostische oder therapeutische Zwecke mit anderen Molekülen gekoppelt sind, beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen, radioaktiven Markern oder Affinitätskomponenten, sowie Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und der zu diesen Nukleinsäuren komplementären Nukleinsäuren sowie Varianten der Nukleinsäuren.

Fragmente bezeichnet dabei Nukleinsäuren, die am 5' oder 3' oder an beiden Seiten verkürzt sind. Unter dem Begriff "Varianten" wird verstanden, daß diese Nukleinsäuren unter stringenten Bedingungen mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. dazu komplementären Nukleinsäuren hybridisieren. Unter dem Begriff "stringente Bedingungen" wird verstanden, daß die Hybridisierung bei Bedingungen durchgeführt wird, bei der die Temperatur noch bis zu 10°C unter der Temperatur liegt (bei sonst identischen Bedingungen), bei der exakt komplementäre Nukleinsäuren gerade noch hybridisieren würden. Wenn beispielsweise eine exakt hybridisierende Nukleinsäure unter gegebenen Bedingungen bis zu einer Temperatur von ca. 55°C hybridisiert, dann sind stringente Bedingungen Temperaturen gleich oder höher 45°C. Bevorzugt ist der Temperaturbereich für stringente Bedingungen von 5°C, noch mehr bevorzugt von 3°C.

Desweiteren betrifft die Erfindung Antikörper, die gegen die erfindungsgemäße nSMase oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gerichtet sind. Diese Substanzen eignen sich insbesondere zum Einsatz in der Diagnostik, dem Fachmann an sich bekannten Immunoassays, zur histologischen Untersuchung sowie als Arzneimittel zur Behandlung von Zuständen, die mit einer Überexpression der nSMase verbunden sind. Solche erfindungsgemäßen Antikörper können mit dem Fachmann an sich bekannten Verfahren durch

Immunisierung mit nSMase, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder Peptid- und Nukleinsäurenfragmenten in Gegenwart von Hilfsreagenzien erhalten werden.

Weiterhin sind Gegenstand der Erfindung Zelllinien, die die erfindungsgemäße nSMase überexprimieren. Solche Zelllinien sind erhältlich durch Transfektion mit Vektoren, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für nSMase kodieren, enthalten. Im Falle von eukaryontischen Zelllinien kann die Transfektion beispielsweise durch Elektroporation erfolgen. Die Zelllinien sind dabei vorzugsweise stabiltransfiziert.

Überexpression bedeutet in diesem Zusammenhang, daß diese Zelllinie eine höhere Aktivität der nSMase aufweisen als die Zelllinien, die nicht mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren transfiziert wurden. Geeignete eukaryontische Zelllinien sind beispielsweise die Zelllinien U937, HEK 293 oder Jurkat.

Die Zelllinien zeigten in Experimenten eine spezifische nSMase-Aktivität zwischen 0,3 und 10 $\mu\text{mol/mg}$ Protein/Stunde.

Figur 3 zeigt die Northern und Western Blot Analyse der nSMase-Expression in transfizierten Zelllinien. Teil A zeigt dabei das Ergebnis einer RT-PCR der Gesamtzelle RNA mit Primern, die mit humaner und muriner nSMase cDNA hybridisieren. Teil B zeigt als Kontrolle die T-PCR der Gesamt-RNA mit Primern, die zu humanem β -Actin cDNA hybridisieren. Teil C zeigt den Westernblot des Plasma Membran Proteinextrakts von verschiedenen HEK 293 Zelllinien nach SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Hybridisierung mit dem polyklonalen Anti-nSMase-Antikörpern.

Die Zugabe von 0,5 mM Arachidonsäure führte zu einer dreifachen Erhöhung der nSMase-Aktivität in den überexprimierenden HEK-Zellen.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein transgenes Säugetier, das eine Überexpression (gain of function) oder eine Gendefi-

zienz bzw. einen Gendefekt (loss of function) für die erfindungsgemäße nSMase aufweist. Bevorzugt handelt es sich bei dem Säugetier um ein Nagetier, insbesondere eine Maus. Diese transgenen Säugetiere sind durch für den Fachmann an sich bekannte Verfahren erhältlich und eignen sich insbesondere zur Funktionsaufklärung der neutralen Sphingomyelinase. Für transgene Säugetiere werden definierte Genkonstrukte durch DNA-Mikroinjektion in den Vorkern (Pronukleus) einer befruchteten Eizelle im Einzellstadium injiziert, um die Expression des zusätzlichen Gens zu erreichen. Durch zielgerichtete Veränderung eines Gens im Genoms von ES-Zellen, die nachfolgend in Blastozysten injiziert werden, wird die Funktion eines Gens ausgeschaltet.

Die Strategie und Konstrukte zur Generierung der Mausmutanten sind in Figur 4 und 5 gezeigt.

Bevorzugt handelt es sich bei den transgenen Tieren um Tiere, bei denen das Gen zeitlich und gewebsspezifisch von außen induzierbar ein- bzw. ausgeschaltet werden kann. Entsprechende transgene Säugetiere eignen sich insbesondere zur Aufklärung der mit der erfindungsgemäßen nSMase im Zusammenhang stehenden Stoffwechsel- und Signaltransduktionswegen, die wiederum diagnostische oder therapeutische Anwendungen eröffnen. Insbesondere eignen sich die transgenen Säugetiere zum Screening von pharmazeutischen Wirkstoffen.

Die erfindungsgemäße eukaryontische neutrale Sphingomyelinase, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sowie die erfindungsgemäßen Antikörper können in Arzneimitteln und Diagnostikmitteln gegebenfalls zusammen mit weiteren Hilfsstoffen enthalten sein. Diese Arznei- und Diagnostikmittel eignen sich zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Über- oder Unterexpression und/oder einer erhöhten oder verminderten Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase und/oder auf Störungen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und/oder Apoptose beruhen.

Insbesondere sind dies Erkrankungen, bei denen Entzündungsprozesse, Zellwachstumstörungen und Stoffwechselstörungen eine Rolle spielen. Dies können beispielsweise Krebserkrankungen oder Störungen der Cholesterinhomöostase (Arteriosklerose) sein.

Ein erfindungsgemäßes pharmazeutisches Screening-Verfahren beruht auf der Veränderung der Expression oder Aktivität der erfindungsgemäßen nSMase in nSMase-überexprimierenden Zelllinien bei Zugabe von mindestens einer potentiell pharmazeutisch wirksamen Substanz. Die Zelllinien eignen sich somit insbesondere zur Entwicklung und Prüfung von pharmazeutischen Leitstrukturen.

Die Erfindung soll durch die folgenden Beispiele weiter erläutert werden.

Beispiel 1

Klonierung der Nukleinsäure

Die erfindungsgemäßen für die neutrale Sphingomyelinase kodierenden Nukleinsäuren wurden in die NotI Schnittstellen der Klonierungsstelle des eukaryontischen Expressionsvektors pRc/CMV (Stratagene) kloniert. Die erhaltenen Sequenzen wurden durch Sequenzierung mit einem Perkin-Elmer DNA-Sequenzer 377A erhalten.

Beispiel 2

Klonierung der RNA

Die Gesamt-RNA wurde nach bekannten Methoden aus verschiedenen Organen von acht drei Wochen alten CD1 Mäusen isoliert und Poly(A')-RNA wurde durch Affinitätsreinigung an Oligo(dT)cellulose (Boehringer Mannheim Deutschland) gemäß Standardmethoden isoliert.

Beispiel 3*Überexprimierende Zelllinien*

U937 Zellen wuchsen in RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 1 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 0,03% Glutamin bei 37°C und 5% CO₂. 5x10⁶-Zellen wurden mit 1 µg linearisierter Plasmid-DNA, die für die erfindungsgemäße nSMase kodierte durch Elektroporation mit einem "gene pulser" (Firma Bio-Rad) transfiziert. Die Selektion stabiler Klone erfolgte unter 1 mg/ml Geneticin (G418, Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Die aus den Zelllinien aufgereinigte nSMase zeigte eine spezifische Aktivität zwischen 0,3 und 10 µmol/mg Protein/Stunde. Das pH-Optimum lag bei 6,5 und 7,5. Der K_m-Wert für C18 Sphingomyelin betrug 1,0 bis 1,5 x 10⁻⁵ M. Die Aktivität war von der Anwesenheit von Magnesiumionen abhängig; die Zugabe von EDTA inhibierte die Aktivität.

Beispiel 4*Messung der nSMase-Aktivität*

Die enzymatische Aktivität wurde in Zellen und Mäusegewebe untersucht. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und bei 1.000 g sedimentiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und die Zellen wurden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen zerstört. Nach Zentrifugation für 2 min bei 2.500 g gefolgt von einer Extraktion mit Lysepuffer mit 0,2% Triton X-100. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 15 min bei 100.000 g.

Gewebe von drei Wochen alten Mäusen wurde in kaltem Lysepuffer homogenisiert. Die zu untersuchende Menge an Protein oder homogenisiertem Gewebe wurde mit 10 nm (80.000 dpm) [N-¹⁴CH₃]-Sphingomyelin für 30 min bei 37° in einem Gesamtvolumen von 200 µl inkubiert. Dann wurden 100 µl Wasser zugesetzt und unreakiertes Substrat durch Extraktion mit Chloroform-Methanol (2:1, v/v) entfernt. Die Radioaktivität der wässrigen Phase, die

das enzymatisch freigesetzte Phosphocholin enthielt, wurde in einem Sintillationszähler gemessen.

Beispiel 5

Polyklonale Antikörper

Kaninchen wurden mit dem synthetischen Peptide CDPHSDKPFSDHE (entsprechend den Aminosäuren 261 bis 273 der murinen nSMase) gekoppelt an Keyhole-Limpit-Hemocyanin immunisiert. Das polyklonale Antikörperserum wurde durch Chromatographie an Hydroxyapatit und Affinitätschromatographie an einer Säule, an der das oben genannte synthetische Peptide gebunden war, gereinigt.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure kodierend für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.
2. Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sie für die neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers, insbesondere für humane oder murine neutrale Sphingomyelinase kodiert.
3. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die neutrale Sphingomyelinase Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin spaltet und ihre Aktivität von der Zugabe von Magnesiumionen abhängig ist.
4. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 3 oder Seq. ID. Nr. 4.
5. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um DNA, RNA, PNA oder nukleaseresistente Analoga handelt.
6. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um mRNA, cDNA oder genomische DNA handelt.
7. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zur Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6 ist.
8. Eukaryontische neutrale Sphingomyelinase erhältlich durch Expression der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 bis 6, insbesondere mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 1 oder Seq. ID. Nr. 2.

9. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 oder eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 gerichtet sind.
10. Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß sie neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 überexprimiert.
11. Zelllinie gemäß Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine eukaryontische neutrale Sphingomyelinase exprimierende Zelllinie handelt, die auf den Zelllinien U937, HEK 293 oder Jurkat beruht.
12. Transgenes Säugetier mit Überexpression (gain of function) oder Gendefizienz oder Gendefekt (loss of function) für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.
13. Transgenes Säugetier gemäß Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß es ein Nagetier ist.
14. Arzneimittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
15. Diagnostikmittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
16. Verwendung der Arzneimittel gemäß Anspruch 14 oder der Diagnostikmittel gemäß Anspruch 15 zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Über- oder Unterexpression und/oder einer erhöhten oder verminderten Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase und/oder

auf Störungen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und/oder Apoptose beruhen.

17. Verwendung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen um Entzündungsprozesse, Zellwachstumstörungen, Krebs und/oder Stoffwechselstörungen wie Störungen der Cholesterinhomöostase (Arteriosklerose) handelt.
18. Verfahren zum Screening von Wirkstoffen dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Expression oder Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase in Zelllinien gemäß Anspruch 10 bei Zugabe von mindestens einer möglichen pharmazeutisch wirksamen Substanz gemessen wird.
19. Verwendung der Zelllinie gemäß Anspruch 10 zur Entwicklung und Prüfung von pharmazeutischen Leitstrukturen.
20. Verfahren zur Herstellung der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 durch chemische Peptidsynthese oder durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen, insbesondere in eukaryontischen Expressionssystemen.
21. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 durch chemische Synthese oder durch Vervielfältigung in gentechnisch veränderten Organismen.
22. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um das Gen für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase handelt und neben codierenden Bereich (Exons) nicht codierende Bereiche (Introns) aufweist, insbesondere ein Gen mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 5 und Seq. ID. Nr. 6.

23. Varianten der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8.
24. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Derivate, Fragmente oder Varianten der Nukleinsäuren handelt.

human neutral Sphingomyelinase (NSM) Gene Sequence

ACCGCGCCGCTCGCTGGAGAGTTGAGCGCCCTAGCGCCCTGGAGCTCCCCAACCATGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1 TGGCGCCGGCAGCGACCTCTCAAGCTCGGCGGATCGCGGGACCTCGAGGGTTGGTACT 60
E I
AGCCCAACTTCTCCCTGCGACTGCGGATCTTCAACCTCAACTGCTGGTGAGTGCGTCTGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
61 TCGGGTTGAAGAGGGACGCTGACGCCTAGAAGTTGGAGTTGACGACCACTCACGCAGACG 120
GGAGTGCGGTCTGGGGGCCACCTTCCGTTTCGCACCCATGCAGCCTTCTCCCCCTATCCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
121 CCTCAGCCAGACCCCGGTGGAAGGCAAGCGTGGGTACGTCGGAAGGAGGGGATAGGG 180
GCCCCACGATCTCAGGGTGTAGGGAAACCCGAACCTCCAAAGTCCACATCTGGCCCCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
181 CGGGGTGCTAGAGTCCACATCCCTTTTGGGCTTGGAGGTTTCAGGTGTAGACCGGGGTC 240
CGCCGGTGGTCCCAGCAGTCGCCTCCCTGCCCCGCTCTTCCCTTCTTAGGGGCATTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
241 GCGGCCACAGGGTCGTCAGCGAGGGGACGGGGCGAGAAGGAAGGAATCCCCGTAAGG 300
GTACTTGAGCAAGCACCGGGCCGACCGCATGAGGCGCTGGGAGACTTTCTGAACCAGGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
301 CATGAACTCGTTCTGTCGCCCGGCTGGCGTACTCCGCGGACCCTCTGAAAGACTTGGTCTT 360
E II
GAGCTTCGACCTGGCTTTGCTGGAGGAGGTGAGATTGTGCAGCACGGTGCGGAACCCAGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
361 CTCGAAGCTGGACCGAAACGACCTCCTCCACTTAACACGTCGTGCCACGCCTTGGGTCC 420
CTGGGAGGAGGGACAGACCGTCCCCTGGGGAAAGACCAAGCAGGCATCCTCACCCTTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
421 GACCTCCTCCCTGTCTGGCAGGGTGACCCCTTTCTGGTTCGTCCGTAGGAGTGGCGAAG 480
CCTCAGGTGTGGAGTGAGCAGGACTTCCAGTACCTGAGACAGAAGCTGTACCTACCTAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
481 GGAGTCCACACCTCACTCGCTGAAGGTCATGGACTCTGTCTTCGACAGTGGATGGATG 540
E III
CCAGCTGCACACCACTTCCGGAGGTGAGAAGCCCACTGGCCTGAAGCCTGTTGTCTATCCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
541 GGTGACGTGTGGTGAAGGCCTCCACTCTTCGGGTGACCGGACTTCGGACAACAGTAGGG 600
AGGAGGCTCTTGGCCCTGCCAGCCCTTCCCTATCCTGCCTGCACTCTCCAGTCTCCTCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
601 TCCTCCGAGAACCAGGGACGGTCGGGAAGGGATAGGACGGACGTGAGAGGTCAGAGGAGGT 660
GCCTCCTCTCCCTCTGGATGTGAGAGAAGGAGAAGGGTGAACCAAGAAGGTCTATGACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
661 CGGAGGAGAGGGAGACCTACACTCTCTTCCCTCTTCCCACTTGGTTCTTCCAGGATACTGA 720
TCAGCCCATTTTCACTTTGTTTTCTGGCTGCCCTATACTCCTCCAAAGGCCGTGCGCTTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
721 AGTCGGGTAAAGTCGAAACAAAAGACCGACGGGATATGAGGAGGTTTCCGGCAGCGGAAC 780
GTTCTAGGGCTAGTCCCAGCAGTAGAAAAAGAAAAAATAGCTGATCAGAGCTGGAAGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
781 CAAGATCCCGATCAGGGTCGTATCTTTTCTTTTATCGACTAGTCTCGACCTTCTG 840
AAGGGAGGGGAAGAAGGCTGGGTGTCTCTCCCTGTTTTCTGGTTATTAAGCAGGGCTTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
841 TTCCCTCCCTTCTTCCGACCCACAGAGAGGGACAAAAAGACCAATATTCGTCCCGAAC 900

Figur 1-1

2 / 12

CTCTCCCTCCTTCTCCCCACATCCTAGCATGAGCCAATGATTCCCTTAGGGCTCTGAGG
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
GAGAGGGGAGGAAGAGGGGGTGTAGGATCGTACTCGGTTACTAAGGGAATCCCGAGACTCC
E VIII
AAGGCAACACAATGGTACCCAAGAACTGNTACGTCAGCCAGCAGGAGCTGAAGCCATTTC
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
TTCCGTTGTGTTACCATGGGTTCTTGACNATGCAGTCGGTCGTCTCGACTTCGGTAAAG
CCTTTGGGTGTCGCGATTGACTACGTGCTTTACAAGGTCAGGCTCCTCCCTTCAACATGCT
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
GGAAACCACAGGCGTAAGTATGACGAAATGTTCCAGTCCGAGGAGGGAAGTTGTACGA
TTCATATGCTGTGTCTCTTTGTCTACTAACCTGTGTAGATCCTTTGCTCAGNTAGTCTAG
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
AAGTATACGACACAGAGAAACAGATGATTGGACACATCTAGGAAACGAGTCNATCAGATC
TCTTGGACCACTGATGGGTGGAAAGTGGGGTAGCCGGGAGCTGGTTCTCTGGGAAGAGGC
2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
AGAACCTGGTGACTACCCACCTTTCACCCCATCGGCCCTCGACCAAGAGACCTTCTCCG
CCTCATATATAAGCTTCTCTNTGGCCCTTACTTTTCTAGGCAGTTTCTGGGTTTACAT
2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
GGAGTATATATTGAAAGAGANACCGGAATGAAAGGATCCGTCAAAGACCCAAAATGTA
CTCCTGTAAGAGTTTTTGAACCACTACAGGCTTTGACCTNACAGGGGCACCCCTCTC
2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
CAGGACATTCTCAAACTTTGGTGATGTCCGAACTGGGANTGTCCCGTGGGGGGAGAG
E IX
TTGATCATGAAGCCCTGATGGCTACTCTGTTTGTGAGGCACAGCCCCACAGCAGAACC
2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
AACTAGTACTTCGGGACTACCGATGAGACAAACACTCCGTGTGGGGGGTGTCTGTTGG
CCAGCTCTACCCACGGTGAGTCACCCCACTTTCCTTGGCCCTTGCCCCGCTTGAAGC
2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
GGTCGAGATGGGTGCCACTCAGTGGGGGTGGGAAAGGAACCGGAACGGGGCGAACTTCG
AGCCCTTCCACTCTTGACTCTCTCCTGCCCACTGCCCTGCTCTGTTGTAGGACCAGCAG
2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
TCGGGAAGGTGAGAACTGAGAGAGGACGGGGTGACGGGACGAGACAACATCCTGGTCGTC
AGAGGTGCGCGTTGATGTGTGTGCTAAAGGAGGCCTGGACGGAGCTGGGTCTGGGCATGG
2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
TCTCCAGCGGCAACTACACACAGATTTCCTCCGGACCTGCCTCGACCCAGACCCGTACC
CTCAGGCTCGCTGGTGGGCCACCTTCGCTAGCTATGTGATTGGCCTGGGGCTGCTTCTCC
2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
GAGTCCGAGCGACCACCCGGTGAAGCGATCGATACTAACCAGACCCCGACGAAGAGG
E X
TGGCACTGCTGTGTCTCTGGCGGCTGGAGAGGGGCGGGGAAGCTGCCATACTGCTCT
2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
ACCGTGACGACACACAGGACCGCGACCTCCTCCCCGGCCCTTCGACGGTATGACGAGA
GGACCCCACTGTAGGGCTGGTGTGTGGGCAGGTGCATTCTACCTCTTCCACGTACAGG
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
CCTGGGGGTACATCCCGACCACGACACCCGTCCACGTAAGATGGAGAAGGTGCATGTCC
AGGTCAATGGCTTATATAGGGCCAGGCTGAGCTCCAGCATGTGCTAGGAAGGGCAAGGG
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
TCCAGTTACCGAATATATCCCGGTCCGACTCGAGGTGCTACACGATCCTTCCCGTTCCC
AGGCCCAGGATCTGGGCCAGAGCCTCAGCCAGCCCTACTCCTGGGGCAGCAGGAGGGGG
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
TCCGGGTCTAGACCCGGGTCTCGGAGTCGGTCGGGATGAGGACCCCGTCTCTCTCCCC
ACAGAACTAAAGAACAAATAAGCTTGGCCCAA

Figur 1-2

3 / 12

2821 -----+-----+-----+--- 2852
TGTCTTGATTCTGTGTTATTCGAACCGGGTT

Figur 1-3

4 / 12

Mouse Neutral Sphingomyelinase (nSMase) gene sequence

```

TNGANNCTGTTAGCTCCAGNCCGGTNGGTCGCCGTNCTAGNCNNATCTNTATAGCTCTTC
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ANCTNNGACAATCGAGGTCNGGCCANCCAGCGGCANGATCNGNNTAGANATATCGAGAAG

GTTGCGAGCNCAATTNNNTCTCAATAAANGGATNCANCCCTATGACAGAACGTGGACCCC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CAACGCTCGNGTTAANNNAGAGTTATTTNCCTANGTNGGGATACTGTCTTGACACCTGGGG

CGCCCCCCANNCANGNGANACCGCGGCATGGGNTGAGGTGCNCANGGTGTCTGGGGCG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GCGGGCGGTNGGTNCNCTNTGGCGCCGTACCCNGACTCCACGNGTNCACAGACCCCCG

AGGGGTTACCTCAGCGATGGTCTTTGACACCTGAAAGCTGGAGCTTTTGAANAGCCCCAN
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TCCCCAATGGAGTCGCTACCAGAACTGTGGACTTTGACCTCGAAACTTNTCGGGGTN

CACCTTCAGCTTCAGGGGCGGCTCNGGCGGCAACCGCACGTGANATGCTGGGGGCTTCGA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GTGGAAGTCGAAGTCCCCGCCGAGNCCGCCGTTGGCGTGCACTNTACGACCCCCGAAGCT

CTTGGGCCGGCACGGNTGCTGGGTGGCCATGGAANNACAGNACAGAGCCCCGNACACAA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GAACCCGGCCGTGCCNACGACCCACCGGTACCTTNNNTGTCNTGTCTCGGGCCNTGTGTT

ATANTGCGAGTCGCCANGGNAACCGCGTGGCTCCTCCCCGAACGCCCNCAAGGGGCGGGA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TATNACGCTCAGCGGTNCCNTTGGCGCACCGAGGAGGGGCTTGCGGGNGTCCCCGCCCT

CCTGAGTGAGTTCTNTGGGCGGGGCTCNCATCAACTTCAAGCCTGTTGCTGGTGGAAGCC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GGACTCACTCAAGNACCCGCCCGGAGNGTAGTTGAAGTTCGGACAACGACCACCTTCGG

GAGCCGGGAACAAGGGAGGAACCTGTAGGCCGCGGTGCGGATAACCCACCGAAGGACCTA
E I 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
CTCGGCCCTTGTTCCCTCCTTGACATCCGGCGCCACGCCTATTGGGTGGCTTCCTGGAT

AGAATCTGGAACAGTCCACCCGAGATTCTTCCAGGACTGCCGGCGGACTCTCGCATTCA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TCTTAGACCTTGTCAGGTGGGCTCTAAGGAAGGTCTGACGGCCGCTGAGAGCGTAAGT

GCCCCGGGATTTGCAGCCGACCTTCTTCCGGGTGGAATGACGGCCTTTGTCCCAGTAACG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CGGGCCCTAAACGTCGGCTGGAAGAAAGGCCACCTTACTGCCGGAACAGGGTCATTGC

CAGGAGTCNNCCCCACCCCCAACCGCTCGCGTTCTTGGGTGCGGGCAGCGCAGGATAGG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
GTCCTCAGNNGGGGTGGGGGTGGTTCGAGCGCAAGGACCCAGCCCCGTGCGTCTATCC

GCAATAAGCCTGTGCGCGCAATCCGCCTCGCCGCCCTTGCTCCGAAGCACTCCAGCCATG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CGTTATTGAGACACGCGCGTTAGGCGGAGCGCGGGAACGAGGCTTCGTGAGGTGCGTAC

AAGCTCAACTTTTCTCTACGGCTGAGAGTTTTCAATCTCAACTGCTGgtaagtaagtgt
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
TTCGAGTTGAAAAGAGATGCCGACTCTCAAAGTTAGAGTTGACGACCattcattcacga

```

Figur 2-1

5 / 12

cccaggcgtgggCTGCAGCCTCGGAGCCACCTTCCAGTCCCCTCTCGCACATGCCTAGGA
841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
gggtccgcaccccGACGTCGGAGCCTCGGTGGAAGGTCAGGGGAGAGCGGTACGGATCCT

AGGAAGCAGGTCTTCTTCAGCCGAGCTAGACCCTGTCCTTCCCGAACCACCAAAGTCCAC
901 -----+-----+-----+-----+-----+ 960
TCCTTCGTCCAGAAGAAGTCGGCTCGATCTGGGACAGGAAGGGCTTGGTGGTTTCAGGTG

ATCGCCTAAAGACCAGAGCTTGGGTGGTTGCAGCAATCACCAAAGTCCCTATCATCCAAA
961 -----+-----+-----+-----+-----+ 1020
TAGCGGATTTCTGGTCTCGAACCACCAACGTCGTTAGTGGTTTCAGGGATAGTAGGTTT

GCTGAGGTGATGACAGCAGTAATCGTCCCAAACCTGGCCCATGTCTTTCCTTTTAAATGA
1021 -----+-----+-----+-----+-----+ 1080
CGACTCCACTACTGTCTCATTAGCAGGGTTTGGACCGGGTACAGAAAGGAAAATTACT

TTTACTTTTATTTTATGTACATTTGGTGTTTTGCTGTATGTATGTCTGTGTGAAGGTGC
1081 -----+-----+-----+-----+-----+ 1140
AAATGAAAATAAAATACATGTAACCACAAAACGGACATACATACAGACACACTTCCACG

CAGATTCTCTGGAACCTGGAGTTACAGACAGTTGTAAGCTGTCATGTGCTTGCTGGAAATT
1141 -----+-----+-----+-----+-----+ 1200
GTCTAAGAGACCTTGACCTCAATGTCTGTCAACATTCGACAGTACACGAACGACCTTAA

GAACTGCTGACCCATCTCTTCTGCCCCCTGCGTCTCCACCCCTTTTAGGGACATCCCCT
1201 -----+-----+-----+-----+-----+ 1260
CTTGACGACTGGGTAGAGAAGACGGGGGACGACGAGGTGGGGAAAATCCCTGTAGGGGA

ACCTGAGCAAACATAGGGCGGACCGCATGAAGCGCTTGGGAGACTTTCTGAACTTGGA
1261 -----+-----+-----+-----+-----+ 1320
TGGACTCGTTTGTATCCCGCTGGCGTACTTCGCGAACCCCTCTGAAAGACTTGAACCTTT

E II

ACTTTGATCTGGCTCTCCTGGAGGAGGTGAGGTTGTAGGGCAGGCTAGGTTGGAGGAGGG
1321 -----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TGAAACTAGACCGAGAGGACCTCCTCCACTCCAACATCCCGTCCGATCCAACCTCCTCCC

CAGCAGGCGGCAGGCGGCGGCAGGAAAACCTGTTCTGTCTTGGGATGAAATCCCAAGCAA
1381 -----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GTCGTCCGCCGTCCGCCGCCGTCTTTGAACAAGACAGAACCCTACTTTAGGGTTCGTT

GTATCCTCACCTTCTTCTCCAGGTGTGGAGTGAGCAGGACTTCCCAGTACCTAAGGCAA
1441 -----+-----+-----+-----+-----+ 1500
CATAGGAGTGGAAGAAGGAGGTCCACACCTCACTCGTCTGAAAGGGTCATGGATTCCGTT

E III

AGGCTATCGCTCACCTATCCAGATGCACACTACTTCAGAAGGTGAAAAGCCTGTGTCTC
1501 -----+-----+-----+-----+-----+ 1560
TCCGATAGCGAGTGGATAGGTCTACGTGTGATGAAGTCTTCCACTTTTCGGACACAAGAG

AGCCTGTTCTCAGACGAGGAAGCTCTCCAACATTTCTTGCTTGCACCCTCGATCTTCTTCC
1561 -----+-----+-----+-----+-----+ 1620
TCGGACAAGAGTCTGCTCCTTCGAGAGGTTGTAAGAACGAACGTGGGAGCTAGAAGAAGG

TCTGGGTGTGAGAAGAGCAGGCCGTACCCCTCATCTTGCAAGGGCTGCTGTCTTAGGCTT
1621 -----+-----+-----+-----+-----+ 1680
AGACCCACACTCTTCTCGTCCGGCAGTGGGAGTAGAACGTTCCCGACGACAGAATCCGAA

TGTTCTGGGGTTGATCTTAGCAGTAGAGCTGGGAGACCGCGGAGGGGAAGAGGGCTGGCT
1681 -----+-----+-----+-----+-----+ 1740
ACAAGACCCCAACTAGAAATCGTCATCTCGACCCCTCTGGCGCCTCCCCTTCTCCCGACCGA

Figur 2-2

GGGTACTCCCCTCCTTGCTCTTCTGGTTATTAAGCAAGAGTTGGTTTTTCAGCGGGATGAT
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
CCCATGAGGGGAGGAACGAGAAGACCAATAATTCTGTTCTCAACCAAAAGTCGCCCTACTA

AGGCAGTGGCCTCTGTGTGTTCTCCAACACCCAATCCAGGAAATCTTCCAGCATGTCTA
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
TCCGTACCCGGAGACACACAAGAGGTTTGTGGGTAGGTCCTTTAGAAGGTCGTACAGAT

CAGTCTGAATGGTTACCCCTACATGGTAAGGATCTCTTCCTATCCTTGCTAACACAGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1861 GTCAGACTTACCAATGGGGATGTACCATTCTTAGAGAAGGGATAGGAACGATTGTGTCTG 1920

1921 TGGACGCGACCTTCCTGGGGCCTTGGCAGGAGGGTGTCTAGTACCCTGAGTTTTTGTCTTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
ACCTGCCTCGGAAGGACCCCGAACCCTCTCCACAGTCTATGGGACTCAAAACAGAAG

1981 TCTTGCTGCAGTTCCATCATGGAGACTGGTTCTGTGGGAAGTCTGTGGGGCTGCTGGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
AGAACGGAGCTCAAGGTAGTACCTCTGACCAAGACACCCTTCAGACACCCCGACGACCAC

CTCCGTCTAAGTGGACTGGTGCTCAATGCCTACGTGACTCATGTGAGTGGGGCTAGCCAG
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
GAGGCAGATTACCTGACCACGAGTTACGGATGCACTGAGTACACTACCCCGATCGGTC

2101 GCTTAGGCAGTGGTCAAGCAGCCCAATGCTATGGTGGAGAAGAGACGCCACTAGTTAGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
CGAATCCGTCACCCAGTTCTGTCGGGTTACGATACCACCTCTTCTCTCGGGTGATCAATCA

2161 TCTGCTGCCTGGGGATAAGGCATGGGATCAGAAGCTAGCATTGGGCAAGGTTCACCCATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
AGACGACGGACCCCTATTCCGTACCCTAGTCTTCGATCGTAACCCGTTCCAAGTGGGTAA

CCCTGTCACACTCTGCCATGTGACAGATGACAAGCTTGATTGACAGACCTTCTCTTTGA
2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
GGGACAGTGTGAGACGGTACACTGTCTACTGTTCGAACTAAGTCTGTGCGAAGAGAACT

TTTACCTATTCCACTTTAGCTACATGCTGAGTACAGCCGACAGAAGGACATCTACTTTG
 2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
 AAAGTGGATAAGGTGAAATCGATGTACGACTCATGTCTGGCTGTCTTCTGTAGATGAAAC

2341 CACACCGTGTGGCCCAAGCTTGGGAAGTGGCCAGTTCATCCAGTGTGTGAGCCTGGGGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
GTGTGGCACACCGGGTTCGAACCCCTTGACCGGGTCAAGTAGGTCAACACTCGGACCCGA

2401 TGATGGGGGCTGTGGGGTGGGGACGGGGTTGAGGGATGNGNAANTTATCCTTGAAGAGGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
ACTACCCCCGACCCCCACCCCTGCCCAACTCCCTACNCNTTNAATAGGAACTTCTCCC

2461 CACATAATAAGGGAAGAATTTCTCTCTTGCCGCTCTTCCCCAACTCAGCCACACATCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
GTGTATTATTCCTTCTTAAAGGAGGAACGGCGAGAAGGGGGTTGAGTCGGTGTGTAGGT

AGAATGCAGATGTGGTTCTATTGTGTGGAGACCTCAATATGCACCCCAAAGACCTGGGGCT
2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
TCTTACGTCTACACCAAGATAACACACCTCTGGAGTTATACGTGGGGTTTTCTGGACCCGA

ERSATZBLATT (REGEL 26)

7 / 12

2581 GCTGCCTGCTGAAAGAGTGGACAGGGCTCCATGATGCTTTCGTTGAGACTGAGGACTTTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
CGACGGACGACTTCTCACCTGTCCCGAGGTACTACGAAAGCAACTCTGACTCCTGAAAT

2641 AGGTGAGAGACTGTTTCCCACTCCACACTTGTTCAGTCTTCCTGTCTCTTAGCAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
TCCACTCTCTGACAAAGGGTGGTTGAGGTGTGAACAAGGTGAGAAGGACAGAGAATCGTA

2701 CCTAGCCACCTGTTTCCCTAGGGCTCTGATGATGGCTGTACCATGGTACCCAAGAACTGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
GGATCGGTGGACAAAGGGATCCCGAGACTACTACCGACATGGTACCATGGGTTCTTGACG

E VIII

2761 TACGTCAGCCAGCAGGACCTGGGACCGTTTCCGCTCTGGTATCCGGATTGATTACGTGCTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
ATGCAGTCGGTCGTCCTGGACCCCTGGCAAAGGCAGACCATAGGCCTAACTAATGCACGAA

2821 TACAAGGTCAGGCTCTTATTCCTGGTGTGCTTCTCCAGTATCTTCCTTCTCTGTCACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
ATGTTCCAGTCCGAGAATAAGGGCCACACGGAAGAGTCATAGAAGGAAGGAGACAGTGA

2881 AGCCACGCTTTAGTTACAGTACAGTCTTGGGCCACTGATGGCTAAAGAATAGAATCCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
TCGGGTGCGAAATCAAGTCGATGTCAGAACCCGGTACTACCGATTCTTATCTTAGGAC

2941 TCGGCTGGTCTCTGGGAGAATTTAAGCTTCTCCATGTTCTTGCTCTTCCTAGGCAGTCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
AGCCGACCAAGAGACCCTCTTAAATTGGAAGAGGTACAAGAACGAGAAGGATCCGTCAGA

3001 CTGAGTTCCAGTCTGCTGTGAGACTCTGAAAACCACTACAGGCTGTGACCCTCACAGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
GACTCAAGGTGCAGACGACACTCTGAGACTTTTGGTGATGTCCGACACTGGGAGTGTAC

E IX

3061 ACAAGCCCTTCTCTGATCAGGAGGCCCTCATGGCTACTTTGTATGTGAAGCACAGCCCCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
TGTTGCGGAAGAGACTAGTGCTCCGGGAGTACCGATGAAACATACACTTCGTGTGCGGGG

3121 CTCAGGAAGACCCCTGTACTGCCTGTGTAAGCAGCATTTCCCTTGCCCCCTCTACTTTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
GAGTCCTTCTGGGGACATGACGGACACCATTCTGTCGTAAAGGAAACGGGGGAGATGAAAT

3181 AGGCAGCCCCGCTCCATCCTGACCCTCCCCCTGCTCTACGTTCTCTCTTTTCCAGGCCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
TCCGTGCGGGCGGAGGTAGGACTGGGAGGGGACGAGATGCAAGAGAGAAAAAGGTCCGGG

3241 ACTGGAAGGTCCGATTGATCAGCGTGCTAAGGGAGGCCAGGACAGAGCTGGGGCTAGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
TGACCTTTCCAGGCTAACTAGTCGCACGATTCCCTCCGGTCTGTCTCGACCCCGATCC

E X

3301 CATAGCTAAAGCTCGCTGGTGGGCTGCATTCTCTGGCTATGTGATCGTTTGGGGGCTGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
GTATCGATTTCGAGCGACCAACCCGACGTAAGAGACCGATACACTAGCAAACCCCGACAG

3361 CCTTCTGGTGTGCTGTGTCTCTGGCTGCAGGAGAAGAGGCCAGGGAAGTGGCCATCAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
GGAAGACCACAACGACACACAGGACCGACGTCCTCTCTCCGGTCCCTTCACCGGTAGTA

Figur 2-4

8 / 12

```
CCTCTGCATACCCAGTGTGGGTCTGGTGTGGTAGCAGGTGCAGTCTACCTCTTCCACAA
3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
GGAGACGTATGGGTCAACCCAGACCAGACCATCGTCCACGTCAGATGGAGAAGGTGTT

GCAGGAGGCCAAGGGCTTATGTGCGGGCCAGGCTGAGATGCTGCACGTTCTGACAAGGGA
3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
CGTCCTCCGGTTCCCGAATACAGCCCGGGTCCGACTCTACGACGTGCAAGACTGTTCCCT

AACGGAGACCCAGGACCGAGGCTCAGAGCCTCACCTAGCCTACTGCTTGCAGCAGGAGGG
3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
TTGCCTCTGGGTCTTGGCTCCGAGTCTCGGAGTGGATCGGATGACGAACGTCGTCTCC
stop
GGACAGAGCTTAAGAGCTTAACAATAAACTTGCTTGACACACTCTAGTGGCTCTACCTT
3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660
CCTGTCTCGAATTCTCGAATTGTTATTTGAACGAACTGTGTGAGATCACCAGATGGAA

GTTCTTGCAGAGGCATGATGGGAAGTGAAGGTCAGTGGCCTTGCTACTGTGTGGCTTTA
3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720
CAAGGAACGTCTCCGTACTACCTTGACTTCCAGTCACCGGAACAGTGACACACCGAAAT

GAGCGTTGGCCTCTCACTTGCCCTTTTTTGACACTCCCGTCTCCTGCCAGCACAGAGCAT
3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780
CTCGCAACCGAGAGTGAACGGAACAAACGTGTGAGGGCAGAGGACGGTCGTCTCGTA

AAACCTGTTCATGGTCATAATCCTTTTATTGTAAACAACGAAGCCTCTGACTAAGCAGT
3781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840
TTTGGGACAAGTACCAAGTATTAGGAAAATAACATTTGTTGCTTCGGAGACTGATTGTC

CCAGATGGCGGAGGTACAGCCCTTGATGATGGTGTCTTGCTTACGGGGCAGGGAGGCAGCT
3841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3900
GGTCTACCGCCTCCATGTCGGGAACACTACCACAGAACGAATGCCCGTCCCTCCGTCGA

AACCATCATCTTCTAGCCCTGGGCTCCCATCTATGCAGGCATCTCTCTGAGCCTCCGTTT
3901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3960
TTGGTAGTAGAAGATCGGGACCCGAGGGTAGATACGTCCGTAGAGAGACTCGGAGGCAAG

CTCCTGGAATTGGNTCAGAGCAATCCCGCTTGGTTACCAACCTCCAACAGCTTCCTTA
3961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4020
GAGGACCTTAACCNAGTCTCGTTAGGGCGAACCAAGTGGTTGGAGGTTTGTGCAAGGAAT

AGGACCTGGTTTCTCAAAANGGNAAGGTNCGGGCCTCCGGTCTTCAATANGTTTTCTTAA
4021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080
TCCTGGACCAAAGAGTTTNCNTTCCANGCCCGAGGCCAGAAGTTATNCAAAGGATT

AAAGGGANGAATGAAAANCCTTAAGNNCCAACAAGGGGAACCTTGGNCCCAAAGGGGA
4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4140
TTTCCCTNCTTACTTTTNGGAATTCNNGGTTGTTCCCTTGGAACCNNGGTTTTCCCTT

CCTGGGTGGTTTCCNTTGGGGCCAAANTTATCCCAAAGGGGTCCAATTGAAGGGTTAAC
4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4200
GGACCCACCAAAGGGNAACCCCGGTTTNAATAGGGTTTCCCAGGTTAACTTCCCAATTG

CCCCCAAAAANNACCNTTCCCCCGGAATTTCCAAAGGTTTNNCCCCCCCCGGCAAAANC
4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4260
GGGGGTTTTTNTTGGGNAAGGGGGCCTTAAAGGTTTCCAAANGGGGGGGCGTTTTNG
```

Figur 2-5

9 / 12

```
TCCCTTGGGGNNCCNAANCCNTGGCCCGGNCCTGGCTTTTCCCCCTTTCCCAAGNATTTTC
4261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4320
AGGGAACCCCNNGGNTTNGGNACCGGGCCNGAACCMAAAGGGGAAAGGGTTCNTAAAG

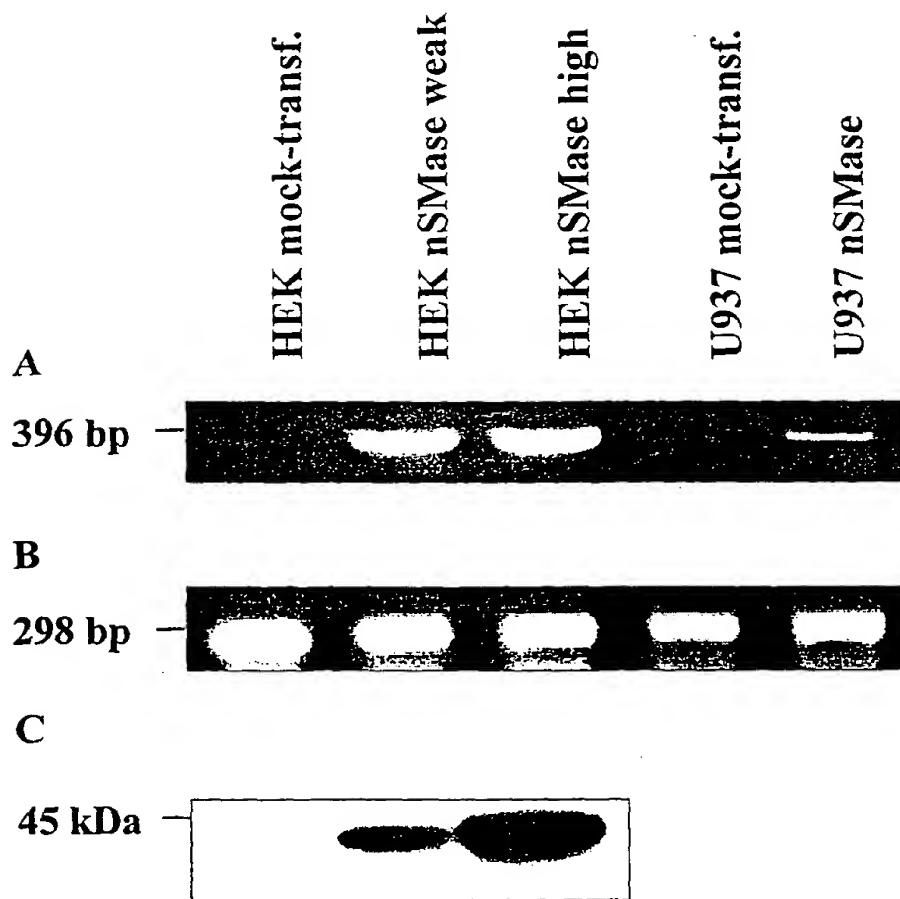
AAANNTTCCCTNGGAAANCCCCCTTGNTTGGNAAAACNAATNANGAACCANGCCAANNNT
4321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4380
TTTNNAAAGGGANCCCTTNGGGGAACNAACCNTTTTGGNTTANTNCTTGGTNCGGTTNNNA

TGCCAANAAACCNTTTGGGCAAAGGGGGNAAATTCAACAANGGGGNAATTGGGGAAACCC
4381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4440
ACGGTTNTTTGGNAAACCCGTTTCCCCNTTTAAGTNGTTNCCCNTTAACCCCTTTGGG

NTGGGTTTNCCCAAAGGGCCCNAAANANT
4441 -----+-----+-----+-----+-----+ 4468
NACCCAAANGGGTTTCCCGGGNTTNTNA
```

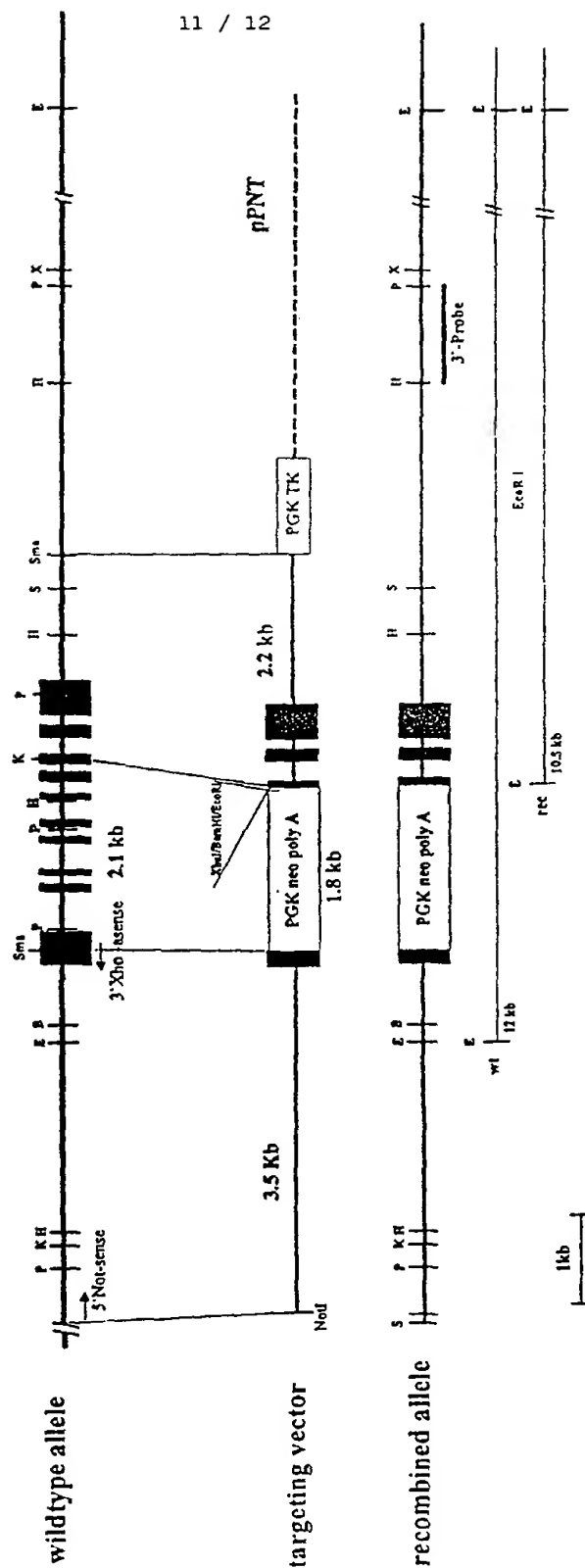
Figur 2-6

10/12



Figur 3

mnSMase "konventional" Knock Out



Figur 4

Konstrukte zur Generierung transgener Mausmutanten

Ubiquitinpromotor	nSMase	IRES	lacZ	polyA

polyA	rtTA	CMV	CMV-1	nSMase	IRES	GFP	polyA

Ubiquitinpromotor: Regulationssequenz des Ubiquitin-Gens, das eine ubiquitäre Transkription steuert.

nSMase: neutrale Sphingomyelinase

lacZ: lacZ, Gen kodiert für die β -Galaktosidase

polyA: Erkennungssignal für die Termination der Transkription und Polyadenylierung

CMV: Cytomegalovirus-Promotor des Cytomegalovirus-Gens, das eine ubiquitäre Transkription steuert.

rtTA: reverser Transaktivator, bindet an den Minimalpromotor und steuert dadurch die Transkription. Die Bindungseigenschaften des Transaktivators werden durch Tetrazyklin beeinflusst. Zugabe von Tetrazyklin läßt den Transaktivator an den Minimalpromotor binden und startet die Transkription, Wegnahme von Tetrazyklin verhindert die Bindung des Transaktivators an den Minimalpromotor und verhindert die Transkription.

CMV-1: Minimalpromotor, Bindung des Transaktivators startet die Transkription.

IRES: internal ribosomal entry sequence, virales Initiationssignal für die Translation.

Figur 5

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Memorec Stoffel GmbH
(B) STRASSE: Stoeckheimer Weg 1
(C) ORT: Koeln
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 50829

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neutrale Sphingomyelinase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: Patent In Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEO ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 423 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Lys Leu Asn Phe Ser Leu Arg Leu Arg Ile Phe Asn Leu Asn Cys
1 5 10 15

Trp Gly Ile Pro Tyr Leu Ser Lys His Arg Ala Asp Arg Met Arg Arg
20 25 30

Leu Gly Asp Phe Leu Asn Gln Glu Ser Phe Asp Leu Ala Leu Leu Glu
35 40 45

Glu Val Trp Ser Glu Gln Asp Phe Gln Tyr Leu Arg Gln Lys Leu Ser
50 55 60



Pro Thr Tyr Pro Ala Ala His His Phe Arg Ser Gly Ile Ile Gly Ser
 65 70 75 80
 Gly Leu Cys Val Phe Ser Lys His Pro Ile Gln Glu Leu Thr Gln His
 85 90 95
 Ile Tyr Thr Leu Asn Gly Tyr Pro Tyr Met Ile His His Gly Asp Trp
 100 105 110
 Phe Ser Gly Lys Ala Val Gly Leu Leu Val Leu His Leu Ser Gly Met
 115 120 125
 Val Leu Asn Ala Tyr Val Thr His Leu His Ala Glu Tyr Asn Arg Gln
 130 135 140
 Lys Asp Ile Tyr Leu Ala His Arg Val Ala Gln Ala Trp Glu Leu Ala
 145 150 155 160
 Gln Phe Ile His His Thr Ser Lys Lys Ala Asp Val Val Leu Leu Cys
 165 170 175
 Gly Asp Leu Asn Met His Pro Glu Asp Leu Gly Cys Cys Leu Leu Lys
 180 185 190
 Glu Trp Thr Gly Leu His Asp Ala Tyr Leu Glu Thr Arg Asp Phe Lys
 195 200 205
 Gly Ser Glu Glu Gly Asn Thr Met Val Pro Lys Asn Cys Tyr Val Ser
 210 215 220
 Gln Gln Glu Leu Lys Pro Phe Pro Phe Gly Val Arg Ile Asp Tyr Val
 225 230 235 240
 Leu Tyr Lys Ala Val Ser Gly Phe Tyr Ile Ser Cys Lys Ser Phe Glu
 245 250 255
 Thr Thr Thr Gly Phe Asp Pro His Ser Gly Thr Pro Leu Ser Asp His
 260 265 270
 Glu Ala Leu Met Ala Thr Leu Phe Val Arg His Ser Pro Pro Gln Gln
 275 280 285
 Asn Pro Ser Ser Thr His Gly Pro Ala Glu Arg Ser Pro Leu Met Cys
 290 295 300



Val Leu Lys Glu Ala Trp Thr Glu Leu Gly Leu Gly Met Ala Gln Ala
 305 310 315 320
 Arg Trp Trp Ala Thr Phe Ala Ser Tyr Val Ile Gly Leu Gly Leu Leu
 325 330 335
 Leu Leu Ala Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Gly Gly Gly Ala Gly Glu
 340 345 350
 Ala Ala Ile Leu Leu Trp Thr Pro Ser Val Gly Leu Val Leu Trp Ala
 355 360 365
 Gly Ala Phe Tyr Leu Phe His Val Gln Glu Val Asn Gly Leu Tyr Arg
 370 375 380
 Ala Gln Ala Glu Leu Gln His Val Leu Gly Arg Ala Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Asp Leu Gly Pro Glu Pro Gln Pro Ala Leu Leu Leu Gly Gln Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asp Arg Thr Lys Glu Gln
 420

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 419 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Leu Asn Phe Ser Leu Arg Leu Arg Val Phe Asn Leu Asn Cys
 1 5 10 15
 Trp Asp Ile Pro Tyr Leu Ser Lys His Arg Ala Asp Arg Met Lys Arg
 20 25 30
 Leu Gly Asp Phe Leu Asn Leu Glu Asn Phe Asp Leu Ala Leu Leu Glu
 35 40 45



Glu Val Trp Ser Glu Gln Asp Phe Gln Tyr Leu Arg Gln Arg Leu Ser
 50 55 60

Leu Thr Tyr Pro Asp Ala His Tyr Phe Arg Ser Gly Met Ile Gly Ser
 65 70 75 80

Gly Leu Cys Val Phe Ser Lys His Pro Ile Gln Glu Ile Phe Gln His
 85 90 95

Val Tyr Ser Leu Asn Gly Tyr Pro Tyr Met Phe His His Gly Asp Trp
 100 105 110

Phe Cys Gly Lys Ser Val Gly Leu Leu Val Leu Arg Leu Ser Gly Leu
 115 120 125

Val Leu Asn Ala Tyr Val Thr His Leu His Ala Glu Tyr Ser Arg Gln
 130 135 140

Lys Asp Ile Tyr Phe Ala His Arg Val Ala Gln Ala Trp Glu Leu Ala
 145 150 155 160

Gln Phe Ile His His Thr Ser Lys Asn Ala Asp Val Val Leu Leu Cys
 165 170 175

Gly Asp Leu Asn Met His Pro Lys Asp Leu Gly Cys Cys Leu Leu Lys
 180 185 190

Glu Trp Thr Gly Leu His Asp Ala Phe Val Glu Thr Glu Asp Phe Lys
 195 200 205

Gly Ser Asp Asp Gly Cys Thr Met Val Pro Lys Asn Cys Tyr Val Ser
 210 215 220

Gln Gln Asp Leu Gly Pro Phe Pro Ser Gly Ile Arg Ile Asp Tyr Val
 225 230 235 240

Leu Tyr Lys Ala Val Ser Glu Phe His Val Cys Cys Glu Thr Leu Lys
 245 250 255

Thr Thr Thr Gly Cys Asp Pro His Ser Asp Lys Pro Phe Ser Asp His
 260 265 270

Glu Ala Leu Met Ala Thr Leu Tyr Val Lys His Ser Pro Pro Gln Glu
 275 280 285



Asp Pro Cys Thr Ala Cys Gly Pro Leu Glu Arg Ser Asp Leu Ile Ser
 290 295 300
 Val Leu Arg Glu Ala Arg Thr Glu Leu Gly Leu Gly Ile Ala Lys Ala
 305 310 315 320
 Arg Trp Trp Ala Ala Phe Ser Gly Tyr Val Ile Val Trp Gly Leu Ser
 325 330 335
 Leu Leu Val Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Gly Glu Glu Ala Arg Glu
 340 345 350
 Val Ala Ile Ile Leu Cys Ile Pro Ser Val Gly Leu Val Leu Val Ala
 355 360 365
 Gly Ala Val Tyr Leu Phe His Lys Gln Glu Ala Lys Gly Leu Cys Arg
 370 375 380
 Ala Gln Ala Glu Met Leu His Val Leu Thr Arg Glu Thr Glu Thr Gln
 385 390 395 400
 Asp Arg Gly Ser Glu Pro His Leu Ala Tyr Cys Leu Gln Gln Glu Gly
 405 410 415
 Asp Arg Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1662 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCGGCCGCGA CCGCCGGGGA CGAGCTTGGA GGAAAAGGAA CCGGGAGCCG CCCACCCGGG 60
 GGCGCTCTCC GGACCCCCAG GGTCTAGCG CGCGGCCCTT ACCGAGCCTG GGCGCCCGGA 120
 TTTCGSAGC GGATCGCCTT TCCGGGTTGG CGGCCCGCCT GATTGGGAAC AGCCGGCCCG 180

TTGCCGGGGG AACGCGGGAG TCGGGCCCCG CCTGAGCCAC GCGGGCTTGG TGCCACCTG	240
TGCGCGCCGC CTGCGAAGAA GGAACGGTCT AGGGAGAAGG CGCCGCCGGC CGCCCCGTC	300
CCCACCGCGG CCGTCGCTGG AGAGTTCGAG CCGCCTAGCG CCCCTGGAGC TCCCCAACCA	360
TGAAGCTCAA CTTCTCCCTG CGACTGCGGA TCTTCAACCT CAACTGCTGG GGCATTCCGT	420
ACTTGAGCAA GCACCGGGCC GACCGCATGA GCGCCTGGG AGACTTTCTG AACCAGGAGA	480
GCTTCGACCT GGCTTTGCTG GAGGAGGTGT GGAGTGAGCA GGACTTCCAG TACCTGAGAC	540
AGAAGCTGTC ACCTACCTAC CCAGCTGCAC ACCACTTCCG GAGCGGAATC ATTGGCAGTG	600
GCCTCTGTGT CTTCTCCAA CATCCAATCC AGGAGCTTAC CCAGCACATC TACACTCTCA	660
ATGGCTACCC CTACATGATC CATCATGGTG ACTGGTTCAG TGGGAAGGCT GTGGGGCTGC	720
TGGTGCTCCA TCTAAGTGGC ATGGTGCTCA ACGCCTATGT GACCCATCTC CATGCCGAAT	780
ACAATCGACA GAAGGACATC TACCTAGCAC ATCGTGTTGG CCAAGCTTGG GAATTGGCCC	840
AGTTCATCCA CCACACATCC AAGAAGGCAG ACGTGTTTCT GTTGTGTGGA GACCTCAACA	900
TGCACCCAGA AGACCTGGGC TGCTGCCTGC TGAAGGAGTG GACAGGGCTT CATGATGCCT	960
ATCTTGAAAC TCGGGACTTC AAGGGCTCTG AGGAAGGCAA CACAATGGTA CCCAAGAACT	1020
GCTACGTCAG CCAGCAGGAG CTGAAGCCAT TTCCCTTTGG TGTCCGCATT GACTACGTGC	1080
TTTACAAGGC AGTTTCTGGG TTTTACATCT CCTGTAAGAG TTTTGAAACC ACTACAGGCT	1140
TTGACCCTCA CAGTGGCACC CCCCTCTCTG ATCATGAAGC CCTGATGGCT ACTCTGTTTG	1200
TGAGGCACAG CCCCCACAG CAGAACCCCA GCTCTACCCA CGGACCAGCA GAGAGGTCGC	1260
CGTTGATGTG TGTGCTAAAG GAGGCCTGGA CGGAGCTGGG TCTGGGCATG GCTCAGGCTC	1320
GCTGGTGGGC CACCTTCGCT AGCTATGTGA TTGGCCTGGG GCTGCTTCTC CTGGCACTGC	1380
TGTGTGTCCT GGCGGCTGGA GGAGGGGCCG GGAAGCTGC CATACTGCTC TGGACCCCCA	1440
GTGTAGGGCT GGTGCTGTGG GCAGGTGCAT TCTACCTCTT CCACGTACAG GAGGTCAATG	1500

GCTTATATAG GGCCAGGCT GAGCTCCAGC ATGTGCTAGG AAGGGCAAGG GAGGCCAGG 1560
 ATCTGGGCCC AGAGCCTCAG CCAGCCCTAC TCCTGGGGCA GCAGGAGGGG GACAGAACTA 1620
 AAGAACAATA AAGCTTGGCC CTTTAAAAAA ·AAAAAAAAAA AA 1662

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1627 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GTGCTGGTGG AAGCCGAGCC GGGAACAAGG GAGGAACCTG TAGGCCGCGG TGCAGAAACC 60
 CACCGAAGAC CTAAGAATCT GGAACAGTCC ACCCGAGATT CCTTCCAGGA CTGCCGGCGG 120
 CTCGCGCACC AGCCCGGGAT TTGCAGCCGA CCTTCTTTCC GGGTGGAAAGG ACGGCCTTTG 180
 TCCCAGTAAC GCAGGAGTCG CCCCCACCC CCAACCAGCT CGCGTTCCTG GGTCGGGGCA 240
 GCGCAGGACA GGGCAATAAG CCTGTGCGCG CAATCCGCCT CGCCGCCCTT GCTCCGAAGC 300
 ACTCCAGCCA TGAAGCTCAA CTTTTCTCTA CGGCTGAGAG TTTTCAATCT CAACTGCTGG 360
 GACATCCCCT ACCTGAGCAA ACATAGGGCG GACCGCATGA AGCGCTTGGG AGACTTTCTG 420
 AACTTGGAAG ACTTTGATCT GGCTCTCCTG GAGGAGGTGT GGAGTGAGCA GGACTTCCAG 480
 TACCTAAGGC AAAGGCTATC GCTCACCTAT CCAGATGCAC ACTACTTCAG AAGCGGGATG 540
 ATAGGCAGTG GCCTCTGTGT GTTCTCCAAA CACCCAATCC AGGAAATCTT CCAGCATGTC 600
 TACAGTCTGA ATGGTTACCC CTACATGTTT CATCATGGAG ACTGTTCTG TGGGAAGTCT 660
 GTGGGGCTGC TGGTGCTCCG TCTAAGTGGA CTGGTGCTCA ATGCCTACGT GACTCATCTA 720
 CATGCTGAGT ACAGCCGACA GAAGGACATC TACTTTGCAC ACCGTGTGGC CCAAGCTTGG 780

GAACTGGCCC AGTTCATCCA CCACACATCC AAGAATGCAG ATGTGGTTCT ATTGTGTGGA	840
GACCTCAATA TGCACCCCAA AGACCTGGGC TGCTGCCTGC TGAAAGAGTG GACAGGGCTC	900
CATGATGCTT TCGTTGAGAC TGAGGACTTT AAGGGCTCTG ATGATGGCTG TACCATGGTA	960
CCCAAGAACT GCTACGTCAG CCAGCAGGAC CTGGGACCGT TTCCGTCTGG TATCCGGATT	1020
GATTACGTGC TTTACAAGGC AGTCTCTGAG TTCCACGTCT GCTGTGAGAC TCTGAAAACC	1080
ACTACAGGCT GTGACCCTCA CAGTGACAAG CCCTTCTCTG ATCACGAGGC CCTCATGGCT	1140
ACTTTGTATG TGAAGCACAG CCCCCCTCAG GAAGACCCCT GTACTGCCTG TGGCCCACTG	1200
GAAAGGTCCG ATTTGATCAG CGTGCTAAGG GAGGCCAGGA CAGAGCTGGG GCTAGGCATA	1260
GCTAAAGCTC GCTGGTGGGC TGCATTCTCT GGCTATGTGA TCGTTTGGGG GCTGTCCCTT	1320
CTGGTGTTGC TGTGTGTCCT GGCTGCAGGA GAAGAGGCCA GGGAAGTGGC CATCATCCTC	1380
TGCATACCCA GTGTGGGTCT GGTGCTGGTA GCAGGTGCAG TCTACCTCTT CCACAAGCAG	1440
GAGGCCAAGG GCTTATGTCT GGCCCAAGGCT GAGATGCTGC ACGTTCTGAC AAGGGAAACG	1500
GAGACCCAGG ACCGAGGCTC AGAGCCTCAC CTAGCCTACT GCTTGCAGCA GGAGGGGGAC	1560
AGAGCTTAAG AGCTTAACAA TAAAACTTGC TTGACACACA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1620
AAAAAA	1627

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4464 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GACTCGATCC CCGCGAACGC TCGCTCGCGC TCCGAGTCTC TTCCAGGTCG CCCTTCCTTG	60
---	----

CGACCAGCAT TTGTTCTCTA TGCCCCCATC CAGCCCTAGG ACAGAACGTG GACCCCCGCC	120
CGCCAGCGCA GGCGACACCG CGGCAGGGGG CTGAGGTGCG CACGGCGTCT GGGGCGAGGG	180
GTTACCTCAG CGATGGTCTT TGACACCTGA AAGCTGGAGC TTTTGAAGAG CCCCACCACC	240
TTCAGCTTCA GGGGCGGCTC GGGCGGCAAC CGCACGTGAC ATGCTGGGGG CTTCGACTTG	300
GGCCGGCAG GCTGCTGGGT GGCCATGGCA GGGACAGCAG AGAGCCCGGA ACACAAATAG	360
TGCGAGTCGC CAGGGCAACC GCGTGGCTCC TCCCCGAACG CCCGCAAGGG GCGGGACCTG	420
AGTGAGTTCG TGGGCGGGGC CTCGCATCAA CTTCAAGCCT GTTGCTGGTG GAAGCCGAGC	480
CGGGAACAAG GGAGGAACCT GTAGGCCGCG GTGCGGATAA CCCACCGAAG GACCTAAGAA	540
TCTGGAACAG TCCACCCGAG ATTCCCTCCA GGAAGTCCCG CGGACTCTCG CATTAGCCCC	600
GGGATTGCA GCCGACCTTC TTTCCGGGTG GAATGACGGC CTTTGTCCCA GTAACGCAGG	660
AGTAGCCCCC CACCCCCAAC CAGCTCGCGT TCCTGGGTCG GGGCAGCGCA GGATAGGGCA	720
ATAAGCCTGT GCGCGCAATC CGCCTCGCCG CCCTTGCTCC GAAGCACTCC AGCCATGAAG	780
CTCAACTTTT CTCTACGGCT GAGAGTTTTT AATCTCAACT GCTGGTAAGT AAGTGCTCCC	840
AGGCGTGGGC TGCAGCCTCG GAGCCACCTT CCAGTCCCCT CTCGCACATG CCTAGGAAGG	900
AAGCAGGTCT TCTTCAGCCG AGCTAGACCC TGTCCCTCCC GAACCACCAA AGTCCACATC	960
GCCTAAAGAC CAGAGCTTGG GTGGTTGCAG CAATCACCAA AGTCCCTATC ATCCAAAGCT	1020
GAGGTGATGA CAGCAGTAAT CGTCCCAAAC CTGGCCCATG TCTTTCCTTT TAAATGATTT	1080
ACTTTTATTT TATGTACATT TGGTGTTTTG CCTGTATGTA TGTCTGTGTG AAGGTGCCAG	1140
ATTCTCTGGA ACTGGAGTTA CAGACAGTTG TAAGCTGTCA TGTGCTTGCT GGAAATTGAA	1200
CTGCTGACCC ATCTCTTCTG CCCCCTGCGT CCTCCACCCC TTTTAGGGAC ATCCCCTACC	1260
TGAGCAAACA TAGGGCGGAC CGCATGAAGC GCTTGGGAGA CTTTCTGAAC TTGGAAAAC	1320
TTGATCTGGC TCTCCTGGAG GAGGTGAGGT TGTAGGGCAG GCTAGGTTGG AGGAGGGCAG	1380

CAGGCGGCAG GCGGCGGCAG GAAAACCTGT TCTGTCTTGG GATGAAATCC CAAGCAAGTA	1440
TCCTCACCTT CTTCTCCAG GTGTGGAGTG AGCAGGACTT CCAGTACCTA AGGCAAAGGC	1500
TATCGCTCAC CTATCCAGAT GCACACTACT TCAGAAGGTG AAAAGCCTGT GTTCTCAGCC	1560
TGTTCTCAGA CGAGGAAGCT CTCCAACATT CTTGCTTGCA CCCTCGATCT TCTTCCTCTG	1620
GGTGTGAGAA GAGCAGGCCG TCACCCTCAT CTTGCAAGGG CTGCTGTCTT AGGCTTTGTT	1680
CTGGGGTTGA TCTTAGCAGT AGAGCTGGGA GACCGCGGAG GGAAGAGGG CTGGCTGGGT	1740
ACTCCCCTCC TTGCTCTTCT GGTTATTAAG CAAGAGTTGG TTTTCAGCGG GATGATAGGC	1800
AGTGGCCTCT GTGTGTTCTC CAAACACCCA ATCCAGGAAA TCTTCCAGCA TGTCTACAGT	1860
CTGAATGGTT ACCCCTACAT GGTAAGGATC TCTTCCCTAT CCTTGCTAAC ACAGACTGGA	1920
CGCAGCCTTC CTGGGGCCTT GGCAGGAGGG TGTCAGTACC CTGAGTTTTT GTCTTCTCTT	1980
GCCTGCAGTT CCATCATGGA GACTGGTTCT GTGGGAAGTC TGTGGGGCTG CTGGTGCTCC	2040
GTCTAAGTGG ACTGGTGCTC AATGCCTACG TGA CT CATGT GAGTGGGGCT AGCCAGGCTT	2100
AGGCAGTGGG TCAAGCAGCC CAATGCTATG GTGGAGAAGA GACGCCACTA GTTAGTTCTG	2160
CTGCCTGGGG ATAAGGCATG GGATCAGAAG CTAGCATTGG GCAAGGTTCA CCCATTCCCT	2220
GTCACACTCT GCCATGTGAC AGATGACAAG CTTGATTCAG ACAGCCTTCT CTTTGATTTC	2280
ACCTATTCCA CTTTAGCTAC ATGCTGAGTA CAGCCGACAG AAGGACATCT ACTTTGCACA	2340
CCGTGTGGCC CAAGCTTGGG AACTGGCCCA GTTCATCCAG TGTGTGAGCC TGGGCTTGAT	2400
GGGGCTGTG GGGTGGGGAC GGGGTTGAGG GATGNGNAAN TTATCCTTGA AGAGGGCACA	2460
TAATAAGGGA AGAATTTCTT CTTGCGCT CTTCCCCAA CTCAGCCACA CATCCAAGAA	2520
TGCAGATGTG GTTCTATTGT GTGGAGACCT CAATATGCAC CCCAAAGACC TGGGCTGCTG	2580
CCTGCTGAAA GAGTGGACAG GGCTCCATGA TGCTTTCGTT GAGACTGAGG ACTTTAAGGT	2640
GAGAGACTGT TTCCCACCA CTCCACACTT GTTCCAGTCT TCCTGTCTCT TAGCATCCTA	2700

GCCACCTGTT	TCCCTAGGGC	TCTGATGATG	GCTGTACCAT	GGTACCCAAG	AACTGCTACG	2760
TCAGCCAGCA	GGACCTGGGA	CCGTTTCCGT	CTGGTATCCG	GATTGATTAC	GTGCTTTACA	2820
AGGTCAGGCT	CTTATTCCCG	GTGTGCCTTC	TCCAGTATCT	TCCTTCCTCT	GTCACTAGCC	2880
CACGCTTTAG	TTCAGCTACA	GTCTTGGGCC	ACTGATGGCT	AAAGAATAGA	ATCCTGTCCG	2940
CTGGTTCTCT	GGGAGAATTT	AAGCTTCTCC	ATGTTCTTGC	TCTTCCTAGG	CAGTCTCTGA	3000
GTTCCACGTC	TGCTGTGAGA	CTCTGAAAAC	CACTACAGGC	TGTGACCCTC	ACAGTGACAA	3060
GCCCTTCTCT	GATCACGAGG	CCCTCATGGC	TACTTTGTAT	GTGAAGCACA	GGCCCCCTCA	3120
GGAAGACCCC	TGTACTGCCT	GTGGTAAGCA	GCATTTCTTT	TGCCCCCTCT	ACTTTAAGGC	3180
AGCCCCGCCT	CCATCCTGAC	CCTCCCCTGC	TCTACGTTCT	CTCTTTTTC	AGGCCCCACTG	3240
GAAAGGTCCG	ATTTGATCAG	CGTGCTAAGG	GAGGCCAGGA	CAGAGCTGGG	GCTAGGCATA	3300
GCTAAAGCTC	GCTGGTGGGC	TGCATTCTCT	GGCTATGTGA	TCGTTTGGGG	GCTGTCCCTT	3360
CTGGTGTGTC	TGTGTGTCCT	GGCTGCAGGA	GAAGAGGCCA	GGGAAGTGGC	CATCATCCTC	3420
TGCATACCCA	GTGTGGGTCT	GGTGCTGGTA	GCAGGTGCAG	TCTACCTCTT	CCACAAGCAG	3480
GAGGCCAAGG	GCTTATGTCT	GGCCAGGCT	GAGATGCTGC	ACGTTCTGAC	AAGGGAAACG	3540
GAGACCCAGG	ACCGAGGCTC	AGAGCCTCAC	CTAGCCTACT	GCTTGCAGCA	GGAGGGGGAC	3600
AGAGCTTAAG	AGCTTAACAA	TAAAACTTGC	TTGACACACT	CTAGTGGCTC	TACCTTGTTT	3660
CTTGACAGAG	CATGATGGGA	ACTGAAGGTC	AGTGGCCTTG	TCACTGTGTG	GCTTTAGAGC	3720
GTTGGCCTCT	CACTTGCCTT	TTTTGCACAC	TCCCGTCTCC	TGCCAGCACA	GAGCATAAAC	3780
CCTGTTTCATG	GTCATAATCC	TTTTATTGTA	AACAACGAAG	CCTCTGACTA	AGCAGTCCAG	3840
ATGGCGGAGG	TACAGCCCTT	GTGATGGTGT	CTTGCTTACG	GGGCAGGGAG	GCAGCTAACC	3900
ATCATCTTCT	AGCCCTGGGC	TCCCATCTAT	GCAGGCATCT	CTCTGAGCCT	CCGTTCCCTCC	3960
TGGAATTGGN	TCAGAGCAAT	CCCGCTTGGT	TCACCAACCT	CCAAACAGCT	TCCTTAAGGA	4020

CCTGGTTTCT CAAAANGGNA AGGTNCGGGC CTCCGGTCTT CAATANGTTT TCCTAAAAAG	4080
GGANGAATGA AAANCCTTAA GNNCCAACAA GGGGAACCCT TGGNCCCAA AGGGGACCTG	4140
GGTGGTTTCC CNTTGGGGCC AAANTTATCC CAAAGGGGTC CAATTGAAGG GTTAACCCCC	4200
CAAAAANNAC CCNTTTCCCC CGGAATTTC CAAAGGTTNC CCCCCCGGC AAAANCTCCC	4260
TTGGGGNNCC NAANCCNTGG CCCGGNCTTG GCTTTTCCCC CTTTCCCAAG NATTTCAAAN	4320
NTTCCCTNGG AAANCCCTT GNTTGGNAAA ACCNAATNAN GAACCANGCC AANNNTTGCC	4380
AANAAACNT TTGGGCAAAG GGGGNAAATT CANCAANGGG GNAATTGGGG AAACCCNTGG	4440
GTTTNCCTCA AGGGCCCNAA NANT	4464

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2852 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ACCGCGGCCG TCGCTGGAGA GTTCGAGCCG CCTAGCGCCC CTGGAGCTCC CCAACCATGA	60
AGCCCAACTT CTCCCTGCGA CTGCGGATCT TCAACCTCAA CTGCTGGTGA GTGCGTCTGC	120
GGAGTGCGGT CTGGGGGCCA CCTTCCGTTC GCACCCATGC AGCCTTCCTC CCCCTATCCC	180
GCCCCACGAT CTCAGGGTGT AGGGAAAACC CGAACCTCCA AAGTCCACAT CTGGCCCCAG	240
CGCCGGTGGT CCCAGCAGTC GCCTCCCCTG CCCCCTCTT CCCTTCCTTA GGGGCATTCC	300
GTACTTGAGC AAGCACCGGG CCGACCGCAT GAGGCGCCTG GGAGACTTTC TGAACCAGGA	360
GAGCTTCGAC CTGGCTTTGC TGGAGGAGGT GAGATTGTGC AGCACGGTGC GGAACCCAGG	420
CTGGGAGGAG GGACAGACCG TCCCCTGGG GAAAGACCAA GCAGGCATCC TCACCGCTTC	480

CCTCAGGTGT GGAGTGAGCA GGA CTTCAG TACCTGAGAC AGAAGCTGTC ACCTACCTAC	540
CCAGCTGCAC ACCACTTCCG GAGGTGAGAA GCCCACTGGC CTGAAGCCTG TTGTCATCCC	600
AGGAGGCTCT TGGCCCTGCC AGCCCTTCCC TATCCTGCCT GCACTCTCCA GTCTCCTCCA	660
GCCTCCTCTC CCTCTGGATG TGAGAGAAGG AGAAGGGTGA ACCAAGAAGG TCCTATGACT	720
TCAGCCCATT TCAGCTTTGT TTTCTGGCTG CCCTATACTC CTCCAAAGGC CGTCGCCTTG	780
GTTCTAGGGC TAGTCCCAGC AGTAGAAAAA GAAAAAATA GCTGATCAGA GCTGGAAGAC	840
AAGGGAGGGG AAGAAGGCTG GGTGTCTCTC CCTGTTTTTC TGGTTATTAA GCAGGGCTTG	900
GCTTTCAGCG GAATCATTGG CAGTGGCCTC TGTGTCTTCT CCAAACATCC AATCCAGGAG	960
CTTACCCAGC ACATCTACAC TCTCAATGGC TACCCCTACA TGGTAAGGCA GACCTTTGAC	1020
CTCTTCCACC TCCCTTCCCC ACCTCCAGTA ATACAAGGTA GAGGAGGCAG CCCTCTGAGA	1080
GCTGCAGGGG ATGGGCAGAA AGATGGTGGC GGTGCCCTGA GTTTCTATCT CCTCCTGCCT	1140
GCAGATCCAT CATGGTGACT GGTTCAGTGG GAAGGCTGTG GGGCTGCTGG TGCTCCATCT	1200
AAGTGGCATG GTGCTCAACG CCTATGTGAC CCATGTGAGT GAAGCTGGCA GTGCCTAGGG	1260
CTGGGACATG CAGCCCAGTC CTGGGACAGA GAGATGGTAC TTCTCTAGCT CTCATACCTG	1320
GGGATGAGGT GTGGGGGCAA GATCTTATAA GGAAGCAATG GGCAAGGCTT ATCCATTGTA	1380
TACCAAACAC CATGCCAAGT GACAGACACA GGCTTGATTC AGACATACCC CTGGGACCCT	1440
CAGTCTTATC TGCTGTGATC TCATCCATCT TGCTCAGCTC CATGCCGAAT ACAATCGACA	1500
GAAGGACATC TACCTAGCAC ATCGTGTGGC CCAAGCTTGG GAATTGGCCC AGTTCATCCA	1560
GTGTGTGAGC CTGGGCTTGA AATGGGAAGT GGGATGGGAC CCAGGGGCTG AGGGTGAACA	1620
AGGCCCCAGT CATGGGGAAG AGCTGGTGAT GGAAGAACTC CCGCCTCACC AACCTGGTTC	1680
CCCCAGCCAC ACATCCAAGA AGGCAGACGT GGTTCGTGTG TGTGGAGACC TCAACATGCA	1740
CCCAGAAGAC TGGGCTGCTG CCTGCTGAAG GAGTGGACAG GGCTTCATGA TGCCTATCTT	1800

GAAACTCGGG	ACTTCAAGGT	GAGGACTTGC	CTGTTACTTC	CCCACCTATA	TCCCCAGCTT	1860
CTCTCCCTCC	TTCTCCCCCA	CATCCTAGCA	TGAGCCAATG	ATTCCCTTAG	GGCTCTGAGG	1920
AAGGCAACAC	AATGGTACCC	AAGAACTGNT	ACGTCAGCCA	GCAGGAGCTG	AAGCCATTTT	1980
CCTTTGGTGT	CCGCATTGAC	TACGTGCTTT	ACAAGGTCAG	GCTCCTCCCT	TCAACATGCT	2040
TTCATATGCT	GTGTCTCTTT	GTCTACTAAC	CTGTGTAGAT	CCTTTGCTCA	GNTAGTCTAG	2100
TCTTGGACCA	CTGATGGGTG	GAAAGTGGGG	TAGCCGGGAG	CTGGTTCTCT	GGGAAGAGGC	2160
CCTCATATAT	AAGCTTCTCT	NTGGCCCTTA	CTTTTCCTAG	GCAGTTTCTG	GGTTTTACAT	2220
CTCCTGTAAG	AGTTTTGAAA	CCACTACAGG	CTTTGACCCT	NACAGGGGCA	CCCCCTCTC	2280
TTGATCATGA	AGCCCTGATG	GCTACTCTGT	TTGTGAGGCA	CAGCCCCCCA	CAGCAGAACC	2340
CCAGCTCTAC	CCACGGTGAG	TCACCCCCAC	CCTTTCCTTG	GCCCTTGCCC	CGCTTGAAGC	2400
AGCCCTTCCA	CTCTTGACTC	TCTCCTGCCC	CACTGCCCTG	CTCTGTTGTA	GGACCAGCAG	2460
AGAGGTCGCC	GTTGATGTGT	GTGCTAAAGG	AGGCCTGGAC	GGAGCTGGGT	CTGGGCATGG	2520
CTCAGGCTCG	CTGGTGGGCC	ACCTTCGCTA	GCTATGTGAT	TGGCCTGGGG	CTGCTTCTCC	2580
TGGCACTGCT	GTGTGTCCTG	GCGGCTGGAG	GAGGGGCCGG	GGAAGCTGCC	ATACTGCTCT	2640
GGACCCCCAG	TGTAGGGCTG	GTGCTGTGGG	CAGGTGCATT	CTACCTCTTC	CACGTACAGG	2700
AGGTCAATGG	CTTATATAGG	GCCCAGGCTG	AGCTCCAGCA	TGTGCTAGGA	AGGGCAAGGG	2760
AGGCCAGGA	TCTGGGCCCA	GAGCCTCAGC	CAGCCCTACT	CCTGGGGCAG	CAGGAGGGGG	2820
ACAGAACTAA	AGAACAATAA	AGCTTGGCCC	AA			2852

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. onal Application No

PCT/EP 98/05127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/55 C12N9/16 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/50 A61K38/43 A01K67/027		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K A61K A01K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., vol. 264, no. 21, 25 July 1989, pages 12554-12561, XP002087487 see the whole document	1-3,5-7, 9,21,24
A	--- see abstract see figures 1,2 see claims 1-30	4,8, 10-20, 22,23
P,X	WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2 July 1998 see abstract see figures 1,2 see claims 1-30	1-3,5-7, 9,14-19, 21,24
--- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">11 December 1998</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">29/12/1998</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center;">Galli, I</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/05127

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KOSTELLOW A ET AL: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE, ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS" FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 30 April 1996, page A1253 XP000644454 see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3
A	<p>CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity." J. BIOL. CHEM., vol. 272, no. 11, 14 March 1997, XP002087488 see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	14-17
A	<p>DATABASE GENBANK Accession No. AA412649, 18 May 1997 HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST." XP002087490 compare with amino acids 247-394 in sequence ID 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-24
P,X	<p>TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 95, no. 7, 31 March 1998, pages 3638-3643, XP002087489 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-11, 20-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05127

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although the claim(s) 16 and 17 relate(s) to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/05127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828445 A	02-07-1998	AU 5809398 A	17-07-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/55 C12N9/16 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/50
A61K38/43 A01K67/027

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A61K A01K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., Bd. 264, Nr. 21, 25. Juli 1989, Seiten 12554-12561, XP002087487 siehe das ganze Dokument	1-3, 5-7, 9, 21, 24
A		4, 8, 10-20, 22, 23
P, X	WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ; UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2. Juli 1998 siehe Zusammenfassung siehe Abbildungen 1, 2 siehe Ansprüche 1-30	1-3, 5-7, 9, 14-19, 21, 24

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Dezember 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Galli, I

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>KOSTELLOW A ET AL: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE, ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS"</p> <p>FASEB JOURNAL, Bd. 10, Nr. 6, 30. April 1996, Seite A1253 XP000644454 siehe Zusammenfassung ---</p>	3
A	<p>CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity."</p> <p>J. BIOL. CHEM., Bd. 272, Nr. 11, 14. März 1997, XP002087488 siehe Zusammenfassung ---</p>	14-17
A	<p>DATABASE GENBANK Accession No. AA412649, 18. Mai 1997 HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST." XP002087490 Vergleiche mit Aminosäuren 247-394 in Seq. ID 1 ---</p>	1-24
P,X	<p>TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?"</p> <p>PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 95, Nr. 7, 31. März 1998, Seiten 3638-3643, XP002087489 siehe das ganze Dokument -----</p>	1-11, 20-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 16 und 17 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgetaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9828445 A	02-07-1998	AU 5809398 A	17-07-1998

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 980645wo Me	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/05127	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/08/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 11/08/1997
Anmelder MEMOREC STOFFEL GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☒ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☒ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
 - Abb. Nr. 3 ☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☐ keine der Abb.
 - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
 - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
**Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 16 und 17
sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen
K rpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich
auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefodert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/55 C12N9/16 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/50
A61K38/43 A01K67/027

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A61K A01K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., Bd. 264, Nr. 21, 25. Juli 1989, Seiten 12554-12561, XP002087487 siehe das ganze Dokument	1-3,5-7, 9,21,24
A	---	4,8, 10-20, 22,23
P,X	WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2. Juli 1998 siehe Zusammenfassung siehe Abbildungen 1,2 siehe Ansprüche 1-30 ---	1-3,5-7, 9,14-19, 21,24
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Dezember 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Galli, I



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>KOSTELLOW A ET AL.: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE, ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS"</p> <p>FASEB JOURNAL, Bd. 10, Nr. 6, 30. April 1996, Seite A1253 XP000644454 siehe Zusammenfassung ---</p>	3
A	<p>CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity."</p> <p>J. BIOL. CHEM., Bd. 272, Nr. 11, 14. März 1997, XP002087488 siehe Zusammenfassung ---</p>	14-17
A	<p>DATABASE GENBANK Accession No. AA412649, 18. Mai 1997 HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST." XP002087490 Vergleiche mit Aminosäuren 247-394 in Seq. ID 1 ---</p>	1-24
P,X	<p>TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?"</p> <p>PRC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 95, Nr. 7, 31. März 1998, Seiten 3638-3643, XP002087489 siehe das ganze Dokument -----</p>	1-11, 20-24

Information on patent family members

PCT/EP 98/05127

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. onal Application No
PCT/EP 98/05127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/55 C12N9/16 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/50
A61K38/43 A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K A01K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., vol. 264; no. 21, 25 July 1989, pages 12554-12561, XP002087487 see the whole document	1-3,5-7, 9,21,24
A		4,8, 10-20, 22,23
P,X	WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2 July 1998 see abstract see figures 1,2 see claims 1-30	1-3,5-7, 9,14-19, 21,24
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 1998

Date of mailing of the international search report

29/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Galli, I



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. Application No.
PCT/EP 98/05127

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KOSTELLOW A ET AL: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE, ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS" FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 30 April 1996, page A1253 XP000644454 see abstract</p>	3
A	<p>CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity." J. BIOL. CHEM., vol. 272, no. 11, 14 March 1997, XP002087488 see abstract</p>	14-17
A	<p>DATABASE GENBANK Accession No. AA412649, 18 May 1997 HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST." XP002087490 compare with amino acids 247-394 in sequence ID 1</p>	1-24
P,X	<p>TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?" PRC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 95, no. 7, 31 March 1998, pages 3638-3643, XP002087489 see the whole document</p>	1-11, 20-24



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05127

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although the claim(s) 16 and 17 relate(s) to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/05127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828445 A	02-07-1998	AU 5809398 A	17-07-1998



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm

Postfach 10 22 41

D-50462 Köln

ALLEMAGNE

02. NOV. 1998

F 11.3.35/11.2.98

Date of mailing (day/month/year) 20 October 1998 (20.10.98)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 980645wo Me	International application No. PCT/EP98/05127

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

MEMOREC STOFFEL GMBH (for all designated States except US)

STOFFEL, Wilhelm et al (for US)

International filing date : 11 August 1998 (11.08.98)
 Priority date(s) claimed : 11 August 1997 (11.08.97)
 15 October 1997 (15.10.97)
 18 March 1998 (18.03.98)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 15 October 1998 (15.10.98)

List of designated Offices :

AP : GH,GM,KE,LS,MW,SD,SZ,UG,ZW

EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE

OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG

National : AL,AU,BA,BB,BG,BR,CA,CN,CU,CZ,DE,EE,GE,HR,HU,ID,IL,IS,JP,KP,KR,LC,LK,LR,
 LT,LV,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,PL,RO,SG,SI,SK,SL,TR,TT,UA,US,UZ,VN,YU

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Jocelyne Rey-Millet
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

10

11

12

13

14

15

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. **It is the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

10

11

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

Avk	Sg	W	Da	Hi	HPJ	ME	TW	JH	K
30. DEZ. 1998									
FM 3.99									

Date of mailing (day/month/year) 17 December 1998 (17.12.98)	
Applicant's or agent's file reference 980645wo Me	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP98/05127	International filing date (day/month/year) 11 August 1998 (11.08.98)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 11 August 1997 (11.08.97)
Applicant MEMOREC STOFFEL GMBH et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
11 Augu 1997 (11.08.97)	197 34 764.9	DE	10 Dece 1998 (10.12.98)
15 Octo 1997 (15.10.97)	197 58 501.9	DE	10 Dece 1998 (10.12.98)
18 Marc 1998 (18.03.98)	60/078,386	US	10 Dece 1998 (10.12.98)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Jocelyne Rey-Millet

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:
MEYERS, Hans-Wilhelm
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

AvK	Sg	W	Da	Hi	HPJ	ME	TW	JH	K
26. FEB. 1999									
F 11.03.99									

Date of mailing (day/month/year) 18 February 1999 (18.02.99)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 980645wo Me			
International application No. PCT/EP98/05127	International filing date (day/month/year) 11 August 1998 (11.08.98)	Priority date (day/month/year) 11 August 1997 (11.08.97)	
Applicant MEMOREC STOFFEL GMBH et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU, BR, CN, EP, IL, JP, KP, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AL, AP, BA, BB, BG, CA, CU, CZ, DE, EA, EE, GE, HR, HU, ID, IS, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, OA, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, UZ, VN, YU

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 18 February 1999 (18.02.99) under No. WO 99/07855

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

12

1. 1. 1. 1.

2.

3.

4. 4. 4. 4.

5. 5. 5. 5.

6. 6. 6. 6.

Continuation of Form PCT/IB

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF
THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

Date of mailing (day/month/year) 18 February 1999 (18.02.99)	IMPORTANT NOTICE
Applicant's or agent's file reference 980645wo Me	International application No. PCT/EP98/05127
<p>The applicant is hereby notified that, at the time of establishment of this Notice, the time limit under Rule 46.1 for making amendments under Article 19 has not yet expired and the International Bureau had received neither such amendments nor a declaration that the applicant does not wish to make amendments.</p>	

12

1. 1. 1. 1.

1

1. 1.

1. 1.

1. 1.

1. 1.

1. 1. 1. 1. 1. 1.

1. 1. 1. 1. 1. 1.

1. 1. 1. 1.

1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1.

1. 1. 1. 1. 1. 1.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|---|--|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :
C12N 15/55, 9/16, 5/10, C07K 16/40,
G01N 33/50, A61K 38/43, A01K 67/027 | | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/07855 |
| | | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: | 18. Februar 1999 (18.02.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05127 | | (81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 11. August 1998 (11.08.98) | | Veröffentlicht
<i>Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> | |
| (30) Prioritätsdaten:
197 34 764.9 11. August 1997 (11.08.97) DE
197 58 501.9 15. Oktober 1997 (15.10.97) DE
60/078,386 18. März 1998 (18.03.98) US | | | |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MEM-OREC STOFFEL GMBH [DE/DE]; Stöckheimer Weg 1, D-50829 Köln (DE). | | | |
| (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STOFFEL, Wilhelm [DE/DE]; Kornelimünsterstrasse 14, D-50933 Köln (DE).
HOFMANN, Kay [DE/DE]; Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften, Institut für Biochemie, Med. Fak., Joseph-Stelzmann-Strasse 52, D-50931 Köln (DE).
TOMIUK, Stephan [DE/DE]; Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften, Institut für Biochemie, Med. Fak., Joseph-Stelzmann-Strasse 52, D-50931 Köln (DE). | | | |
| (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE). | | | |
| (54) Title: NEUTRAL SPHINGOMYELINASE | | | |
| (54) Bezeichnung: NEUTRALE SPHINGOMYELINASE | | | |
| (57) Abstract
<p>The invention relates to eukaryontic neutral sphingomyelinase (nSMase) and the use thereof.</p> | | | |
| (57) Zusammenfassung
<p>Die Erfindung betrifft eukaryontische neutrale Sphingomyelinase (nSMase) und seine Anwendung.</p> | | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-around;"><div style="text-align: center;">HEK mock-transf.</div><div style="text-align: center;">HEK nSMase weak</div><div style="text-align: center;">HEK nSMase high</div><div style="text-align: center;">U937 mock-transf.</div><div style="text-align: center;">U937 nSMase</div></div> <div style="margin-top: 10px;">A
396 bp — </div> <div style="margin-top: 10px;">B
298 bp — </div> <div style="margin-top: 10px;">C
45 kDa — </div> | | | |



1. 2. 3. 4.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

| | | |
|--|---|--|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
980645wo Me/kk | WEITERES VORGEHEN | siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416) |
| Internationales Aktenzeichen
PCT/EP98/05127 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
11/08/1998 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)
11/08/1997 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK
C12N15/55 | | |
| Anmelder
MEMOREC STOFFEL GMBH et al. | | |

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.


3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

| | |
|--|--|
| Datum der Einreichung des Antrags


06/03/1999 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts

04. 11. 99 |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:

 Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter

Heimann-Pohl, B

Tel. Nr. +49 89 2399 8713

 |

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05127

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-25 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-21 eingegangen am 26/08/1999 mit Schreiben vom 24/08/1999

Zeichnungen, Blätter:

1/12-12/12 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:

- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
- ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.

2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das

maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

☐ die gesamte internationale Anmeldung.

☒ Ansprüche Nr. 8.

Begründung:

☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 8 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):

siehe Beiblatt

☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

| | |
|--------------------------------|---|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-7, 9-21
Nein: Ansprüche |
| Erfinderische Tätigkeit (ET) | Ja: Ansprüche 1-7,9-21
Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche 1-7,9-15,18-21
Nein: Ansprüche |

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

- 1). Die vorliegende Anmeldung betrifft eukaryontische (humane und murine) neutrale Sphingomyelinase (nSMase) mit einem Molekulargewicht von 47,6 bzw. 47.5 kDa, die dafür codierenden Nukleinsäuren, Antikörper gegen nSMase und Verwendung der nSMase sowie transgene Zellen und Tiere.

- 2). Stand der Technik

D1 (J. Biol. Chem., Bd. 264, Nr. 21, 1989, Seiten 12554-12561) beschreibt eine nSMase aus menschlichem Urin, mit einem Molekulargewicht von 92,000 und einem pH Optimum von 7.4. Diese nSMase wurde 440-fach gereinigt und monospezifische polyklonale Antikörper gegen diese nSMase wurden erhalten. D1 offenbart weder die Aminosäuresequenz dieser nSMase noch die dafür codierende Nukleinsäuresequenz.

- 3). Neuheit

Der Gegenstand der Ansprüche 1-7 und 9-21 scheint gegenüber der Lehre von D1 neu zu sein.

- 4). Erfinderische Tätigkeit

Da das Protein aus D1 mit einem Molekulargewicht von 92 kDa sich offensichtlich von den nSMasen der vorliegenden Anmeldung unterscheidet, können die nSMasen der vorliegenden Anmeldung nicht in naheliegender Weise von der nSMase aus D1 abgeleitet werden. Der Gegenstand der Ansprüche 1-7 und 9-21 scheint somit auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen.

- 5). Klarheit

Die Fragmente des Anspruchs 8 sind nicht technisch definiert oder funktionell limitiert. Es kann bei so kurzen Fragmenten von z.B. 7 Nukleotiden nicht ausgeschlossen werden, daß derartige Fragmente im Stand der Technik bereits bekannt sind. Der Schutzzumfang eines Anspruchs mit einem derartigen Wortlaut

ist daher unklar (Art. 6 PCT).

Anspruch 8 kann daher im Hinblick auf Neuheit und erfinderische Tätigkeit nicht geprüft werden

6). Gewerbliche Anwendbarkeit

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 16 und 17 gewerblich anwendbar sind, enthält der PCT keine eindeutigen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

7). Priorität

Falls die beanspruchte Priorität der vorliegenden Anmeldung nicht gültig sein sollte, was nicht überprüft werden konnte, würden weitere Dokumente (WO A 98 28445 und Proc.Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 95, Nr. 7, 1998, Seiten 3638-3643) neuheitsschädlich relevant.

• •

• • • •

• • • • •

• •

• • • • • • • • • •

• • • • •

• • • •

•

• • • • • • • • • •

• • • • •

• • • •

• • • •

Patentansprüche

1. Eukaryontische neutrale Sphingomyelinase mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 1 oder Seq. ID. Nr. 2 sowie Varianten der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase mit der Seq. ID. Nr. 1 oder mit der Seq. ID. Nr. 2, die hinsichtlich der biologischen und/oder immunologischen Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase entsprechen.
2. Eukaryontische neutrale Sphingomyelinase, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine C- oder N-terminale verkürzte Variante handelt.
3. Nukleinsäure kodierend für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase nach Anspruch 1 oder 2.
4. Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 3 oder Seq. ID. Nr. 4.
5. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 3 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um DNA, RNA, PNA oder nukleaseresistente Analoga, mRNA, cDNA oder genomische DNA handelt.
6. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um das Gen für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase handelt und neben codierenden Bereich (Exons) nicht codierende Bereiche (Introns) aufweist, insbesondere ein Gen mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 5 und Seq. ID. Nr. 6.
7. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zur Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 3 bis 6 ist.

8. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Derivate, Fragmente mit mehr als sechs Nucleotiden oder Varianten der Nukleinsäuren handelt.
9. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 oder eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 3 bis 8 gerichtet sind.
10. Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß sie neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 1 oder 2 überexprimiert.
11. Zelllinie gemäß Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine eukaryontische neutrale Sphingomyelinase exprimierende Zelllinie handelt, die auf den Zelllinien U937, HEK 293 oder Jurkat beruht.
12. Transgenes Säugetier mit Überexpression (gain of function) oder Gendefizienz oder Gendefekt (loss of function) für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 1 oder 2.
13. Transgenes Säugetier gemäß Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß es ein Nagetier ist.
14. Arzneimittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 3 bis 8 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
15. Diagnostikmittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der

Ansprüche 3 bis 8 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.

16. Verwendung der Arzneimittel gemäß Anspruch 14 oder der Diagnostikmittel gemäß Anspruch 15 zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Über- oder Unterexpression und/oder einer erhöhten oder verminderten Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase und/oder auf Störungen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und/oder Apoptose beruhen.
17. Verwendung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen um Entzündungsprozesse, Zellwachstumstörungen, Krebs und/oder Stoffwechselstörungen wie Störungen der Cholesterinhomöostase (Arteriosklerose) handelt.
18. Verfahren zum Screening von Wirkstoffen dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Expression oder Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase in Zelllinien gemäß Anspruch 10 bei Zugabe von mindestens einer möglichen pharmazeutisch wirksamen Substanz gemessen wird.
19. Verwendung der Zelllinie gemäß Anspruch 10 zur Entwicklung und Prüfung von pharmazeutischen Leitstrukturen.
20. Verfahren zur Herstellung der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 durch chemische Peptidsynthese oder durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen, insbesondere in eukaryontischen Expressionssystemen.

21. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 3 bis 8 durch chemische Synthese oder durch Vervielfältigung in gentechnisch veränderten Organismen.

GEÄNDERTES BLATT

1. 1. 1. 1.

1.

1. 1.

1.

1.

1.

1.

1.

1. 1.

1. 1.

1.

1.

1.

1.

1.

1.

1.

1.

1.

1.

1.

1.

1.

1.

1.

human neutral Sphingomyelinase (NSM) Gene Sequence

ACCGCGCCGCTCGCTGGAGAGTTTCGAGCCGCTAGCGCCCTGGAGCTCCCCAACCATGA
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 TGGCGCCGGCAGCGACCTCTCAAGCTCGGCGGATCGCGGGGACCTCGAGGGGTGGTACT
 E I
 AGCCCAACTTCTCCCTGCGACTGCGGATCTTCAACCTCAACTGCTGGTGAGTGCGTCTGC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 TCGGGTTGAAGAGGGACGCTGACGCCTAGAAGTTGGAGTTGACGACCACTCACGCAGACG
 GGAGTGCGGTCTGGGGGCCACCTTCCGTTTCGCACCCATGCAGCCTTCCTCCCCCTATCCC
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 CCTCACGCCAGACCCCGGTGGAAGGCAAGCGTGGGTACGTCGGAAGGAGGGGGATAGGG
 GCCCCACGATCTCAGGGTGTAGGGAAAACCCGAACCTCCAAAGTCCACATCTGGCCCCAG
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 CGGGGTGCTAGAGTCCCACATCCCTTTTGGGCTTGGAGGTTTCAGGTGTAGACCGGGGTC
 CGCCGGTGGTCCCAGCAGTCGCCTCCCCTGCCCCGCTCTTCCCTTCCTTAGGGGCATTCC
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 GCGGCCACCAGGGTCTCAGCGGAGGGGACGGGGCGAGAAGGGAAGGAATCCCCGTAAGG
 GTACTTGAGCAAGCACCGGGCCGACCGCATGAGGCGCTGGGAGACTTTCTGAACCAGGA
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 CATGAACTCGTTCTGTGGCCCGGCTGGCGTACTCCGCGGACCCTCTGAAAGACTTGGTCCT
 E II
 GAGCTTCGACCTGGCTTTGCTGGAGGAGGTGAGATTGTGCAGCACGGTGCGGAACCCAGG
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 CTCGAAGCTGGACCGAAACGACCTCCTCCACTCTAACACGTCGTGCCACGCCTTGGGTCC
 CTGGGAGGAGGGACAGACCGTCCCCTGCGGAAAGACCAAGCAGGCATCCTCACCGCTTC
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 GACCTCCTCCCTGTCTGGCAGGGTGACCCCTTTCTGGTTCGTCCGTAGGAGTGGCGAAG
 CCTCAGGTGTGGAGTGAGCAGGACTTCCAGTACCTGAGACAGAAGCTGTACCTACCTAC
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 GGAGTCCACACCTCACTCGTCTGAAGGTCATGGACTCTGTCTTCGACAGTGGATGGATG
 E III
 CCAGCTGCACACCACTTCCGGAGGTGAGAAGCCCACTGGCCTGAAGCCTGTTGTCATCCC
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 GGTTCGACGTGTGGTGAAGGCCTCCACTCTTCGGGTGACCGGACTTCGGACAACAGTAGGG
 AGGAGGCTCTTGGCCCTGCCAGCCCTTCCCTATCCTGCCTGCACTCTCCAGTCTCCTCCA
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 TCCTCCGAGAACCAGGACGCTCGGGAAGGGATAGGACGGACGTGAGAGGTCAGAGGAGGT
 GCCTCCTCTCCCTCTGGATGTGAGAGAAGGAGAAGGGTGAACCAAGAAGGTCCTATGACT
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 CGGAGGAGAGGGAGACCTACACTCTCTTCTCTTCCCACTTGGTCTTCCAGGATACTGA
 TCAGCCCATTTCAGCTTTGTTTTCTGGCTGCCCTATACTCCTCCAAAGGCCGTCGCCTTG
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 AGTCGGGTAAAGTCGAAACAAAAGACCGACGGGATATGAGGAGGTTCCGGCAGCGGAAC
 GTTCTAGGGCTAGTCCCAGCAGTAGAAAAAGAAAAAATAGCTGATCAGAGCTGGAAGAC
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 CAAGATCCCAGTCAGGGTCGTCATCTTTTCTTTTTTATCGACTAGTCTCGACCTTCTG
 AAGGGAGGGGAAGAAGGCTGGGTGTCTCTCCCTGTTTTTCTGGTTATTAAGCAGGGCTTG
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 TTCCCTCCCTTCTTCCGACCCACAGAGAGGGACAAAAAGACCAATATTCTGTCCTCGAAC

Figure 1-1

1861 CTCTCCCTCCTTCTCCCCACATCCTAGCATGAGCCAATGATTCCCTTAGGGCTCTGAGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
 GAGAGGGGAGGAAGAGGGGGTGTAGGATCGTACTCGGTTACTAAGGGAATCCCGAGACTCC

E VIII

1921 AAGGCAACACAATGGTACCCAAGAAGTGNACGTCAGCCAGCAGGAGCTGAAGCCATTTC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
 TTCCGTTGTGTTACCATGGGTTCTTGACNATGCAGTCGGTCGTCCTCGACTTCGGTAAAG

1981 CCTTTGGTGTCCGCATTGACTACGTGCTTTACAAGGTCAGGCTCCTCCCTTCAACATGCT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
 GGAAACCACAGGCGTAACTGATGCACGAAATGTTCCAGTCCGAGGAGGGAAGTTGTACGA

2041 TTCATATGCTGTGTCTCTTTGTCTACTAACCTGTGTAGATCCTTTGCTCAGNTAGTCTAG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
 AACTATACGACACAGAGAAACAGATGATTGGACACATCTAGGAAACGAGTCNATCAGATC

2101 TCTTGGAACCACTGATGGGTGGAAAGTGGGGTAGCCGGGAGCTGGTTCTCTGGGAAGAGGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
 AGAACCTGGTGACTACCCACCTTTACCCCATCGGCCCTCGACCAAGAGACCCTTCTCCG

2161 CCTCATATATAAGCTTCTCTNTGGCCCTTACTTTTCTAGGCAGTTTCTGGGTTTTACAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
 GGAGTATATATTCTGAAGAGANACCGGGAATGAAAGGATCCGTCAAAGACCCAAAATGTA

2221 CTCCTGTAAGAGTTTTTGAAACCACTACAGGCTTTGACCCTNACAGGGGCACCCCCCTCTC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
 GAGGACATTCTCAAACTTTGGTGATGTCCGAAACTGGGANTGTCCCGTGGGGGGAGAG

E IX

2281 TTGATCATGAAGCCCTGATGGCTACTCTGTTTGTGAGGCACAGCCCCACAGCAGAACC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
 AACTAGTACTTCGGGACTACCGATGAGACAAACACTCCGTGTGGGGGGTGTCTGTTGG

2341 CCAGCTCTACCCACGGTGAGTCACCCCCACCCCTTTCCTTGGCCCTTGCCCCGCTTGAAGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
 GGTGAGATGGGTGCCACTCAGTGGGGGTGGGAAAGGAACCGGGAACGGGGCGAACTTCG

2401 AGCCCTTCCACTCTTGACTCTCTCCTGCCCACTGCCCTGCTCTGTTGTAGGACCAGCAG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
 TCGGGAAGGTGAGAACTGAGAGAGGACGGGGTGACGGGACGAGACAACATCCTGGTCTGTC

2461 AGAGGTCGCCGTTGATGTGTGTGCTAAAGGAGGCTGGACGGAGCTGGGTCTGGGCATGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
 TCTCCAGCGGCAACTACACACACGATTTCCTCCGACCTGCCTCGACCCAGACCCGTACC

2521 CTCAGGCTCGCTGGTGGGCCACCTTCGCTAGCTATGTGATTGGCCTGGGGCTGCTTCTCC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
 GAGTCCGAGCGACCACCCGGTGAAGCGATCGATACTAACCAGACCCCGACGAAGAGG

E X

2581 TGGCACTGCTGTGTGCTTGGCGGCTGGAGGAGGGGCCGGGGAAGCTGCCATACTGCTCT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
 ACCGTGACGACACACAGGACCGCGACCTCCTCCCCGGCCCCCTTCGACGGTATGACGAGA

2641 GGACCCCCAGTGTAGGGCTGGTGCTGTGGGCAGGTGCATTCTACCTCTTCCACGTACAGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
 CCTGGGGGTCACATCCCGACCACGACACCCGTCCACGTAAGATGGAGAAGGTGCATGTCC

2701 AGGTCAATGGCTTATATAGGGCCCAGGCTGAGCTCCAGCATGTGCTAGGAAGGGCAAGGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
 TCCAGTTACCGAATATATCCCGGGTCCGACTCGAGGTCGTACACGATCCTTCCCGTTCCC

2761 AGGCCCAGGATCTGGGGCCAGAGCCTCAGCCAGCCCTACTCCTGGGGCAGCAGGAGGGGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
 TCCGGGTCCTAGACCCGGGTCTCGGAGTCGGTCGGGATGAGGACCCCGTCTCTCCCCC

ACAGAACTAAAGAACATAAAGCTTGGCCCAA

Figure 1-2

3 / 12

2821 -----+-----+-----+--- 2852
TGTCTTGATTTCTTGTTATTTGGAACCGGGTT

Figure 1-3

Mouse Neutral Sphingomyelinase (nSMase) gene sequence

```

TNGANNCTGTTAGCTCCAGNCCGGTNGGTGCGCCGTNCTAGNCNNATCTNTATAGCTCTTC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ANCTNNGACAATCGAGGTCNGGCCANCCAGCGGCANGATCNGNNTAGANATATCGAGAAG

GTTGCGAGCNCAATTNNNTCTCAATAAANGGATNCANCCCTATGACAGAACGTGGACCCC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CAACGCTCGNGTTAANNNAGAGTTATTTNCCTANGTNGGGATACTGTCTTGACCTGGGG

CGCCCCCCANNCANGNGANACCGCGGCATGGGNCCTGAGGTGCNCANGGTGTCTGGGGCG
121  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GCGGGCGGTNGNGTNCNCTNTGGCGCCGTACCCNGACTCCACGNGTNCACAGACCCCCGC

AGGGGTTACCTCAGCGATGGTCTTTGACACCTGAAAGCTGGAGCTTTTGAANAGCCCCAN
181  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TCCCCAATGGAGTCGCTACCAGAACTGTGGACTTTTCGACCTCGAAACTTNTCGGGGTN

CACCTTCAGCTTCAGGGGCGGCTCNGGCGGCAACCGCACGTGANATGCTGGGGGCTTCGA
241  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GTGGAAGTCGAAGTCCCCGCCGAGNCCGCCGTGGCGTGCACTNTACGACCCCCGAAGCT

CTTGGGCCGGCACGGNTGCTGGGTGGCCATGGAANNNACAGNACAGAGCCCGGNACACAA
301  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GAACCCGGCCGTGCCNACGACCCACCGGTACCTTNNNTGTCNTGTCTCGGGCCTGTGTT

ATANTGCGAGTCGCCANGGNAACCGCGTGGCTCCTCCCCGAACGCCCNC AAGGGGCGGGA
361  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TATNACGCTCAGCGGTNCCNTTGGCGCACCGAGGAGGGGCTTGCGGGNGTTCCCCGCCCT

CCTGAGTGAGTTCNTGGGCGGGGCTCNCATCAACTTCAAGCCTGTTGCTGGTGGAAGCC
421  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GGACTCACTCAAGNACCCGCCCGAGNGTAGTTGAAGTTCGGACAACGACCACCTTCGG

GAGCCGGGAACAAGGGAGGAACCTGTAGGCCGCGGTGCGGATAACCCACCGAAGGACCTA
EI 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
CTCGGCCCTTGTTCCCTCCTTGGACATCCGGCGCCACGCCTATTGGGTGGCTTCCTGGAT

AGAATCTGGAACAGTCCACCCGAGATTCTTCCAGGACTGCCGGCGGACTCTCGCATTCA
541  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TCTTAGACCTTGTCAGGTGGGCTCTAAGGAAGGTCTGACGGCCGCCTGAGAGCGTAAGT

GCCCCGGGATTTGCAGCCGACCTTCTTTCCGGGTGGAATGACGGCCTTTGTCCCAGTAACG
601  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CGGGCCCTAAACGTCGGCTGGAAGAAAGGCCACCTTACTGCCGGAACAGGGTCATTGC

CAGGAGTCNNCCCCACCCCAACCAGCTCGCGTTCCTGGGTGCGGGCAGCGCAGGATAGG
661  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
GTCCTCAGNNGGGTGGGGGTGGTTCGAGCGCAAGGACCCAGCCCCGTGCGGTCCTATCC

GCAATAAGCCTGTGCGCGCAATCCGCCTCGCCGCCCTTGCTCCGAAGCACTCCAGCCATG
721  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CGTTATTTCGACACGCGCGTTAGGCGGAGCGGCGGGAACGAGGCTTCGTGAGGTGCGGTAC

AAGCTCAACTTTTCTCTACGGCTGAGAGTTTTCAATCTCAACTGCTGgtaagtaagtgtc
781  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
TTCGAGTTGAAAAGAGATGCCGACTCTCAAAAGTTAGAGTTGACGACcattcattcacga

```

Figure 2-1


```

cccaggcgtgggCTGCAGCCTCGGAGCCACCTTCCAGTCCCCTCTCGCACATGCCTAGGA
841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
gggtccgcacccGACGTCGGAGCCTCGGTGGAAGGTCAGGGGAGAGCGTGTACGGATCCT

AGGAAGCAGGTCTTCTTCAGCCGAGCTAGACCCTGTCCTTCCCGAACCACCAAAGTCCAC
901 -----+-----+-----+-----+-----+ 960
TCCTTCGTCCAGAAGAAGTCGGCTCGATCTGGGACAGGAAGGGCTTGGTGGTTTCAGGTG

ATCGCCTAAAGACCAGAGCTTGGGTGGTTGCAGCAATCACCAAAGTCCCTATCATCCAAA
961 -----+-----+-----+-----+-----+ 1020
TAGCGGATTTCTGGTCTCGAACCACCAACGTCGTTAGTGGTTTCAGGGATAGTAGGTTT

GCTGAGGTGATGACAGCAGTAATCGTCCCAAACCTGGCCCATGTCTTTCCTTTTAAATGA
1021 -----+-----+-----+-----+-----+ 1080
CGACTCCACTACTGTCGTCATTAGCAGGGTTTGGACCGGGTACAGAAAGGAAAATTTACT

TTTACTTTTATTTTATGTACATTTGGTGTTTTGCCTGTATGTATGTCTGTGTGAAGGTGC
1081 -----+-----+-----+-----+-----+ 1140
AAATGAAAATAAAATACATGTAAACCACAAAACGGACATACATACAGACACACTTCCACG

CAGATTCTCTGGAACCTGGAGTTACAGACAGTTGTAAGCTGTCATGTGCTTGCTGGAAATT
1141 -----+-----+-----+-----+-----+ 1200
GTCTAAGAGACCTTGACCTCAATGTCTGTCAACATTCGACAGTACACGAACGACCTTTAA

GAACTGCTGACCCATCTCTTCTGCCCCCTGCGTCTCCACCCCTTTTAGGGACATCCCCT
1201 -----+-----+-----+-----+-----+ 1260
CTTGACGACTGGGTAGAGAAGACGGGGGACGCAGGAGGTGGGGAAAATCCCTGTAGGGGA

ACCTGAGCAAACATAGGGCGGACCGCATGAAGCGCTTGGGAGACTTCTGAACTTGGAAA
1261 -----+-----+-----+-----+-----+ 1320
TGGACTCGTTTGTATCCCGCCTGGCGTACTTCGCGAACCCTCTGAAAGACTTGAACCTTT

E II
ACTTTGATCTGGCTCTCCTGGAGGAGGTGAGGTTGTAGGGCAGGCTAGGTTGGAGGAGGG
1321 -----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TGAAACTAGACCGAGAGGACCTCCTCCACTCCAACATCCCGTCCGATCCAACCTCCTCCC

CAGCAGGCGGCAGGCGGCGGCAGGAAAACCTTGTCTGTCTTGGGATGAAATCCCAAGCAA
1381 -----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GTCGTCCGCGCTCCGCGCGCGTCTTTTGAACAAGACAGAACCCTACTTTAGGGTTCTGTT

GTATCCTCACCTTCTTCTCCTCCAGGTGTGGAGTGAGCAGGACTTCCCAGTACCTAAGGCAA
1441 -----+-----+-----+-----+-----+ 1500
CATAGGAGTGGAAGAAGGAGGTCCACACCTCACTCGTCCTGAAGGGTCATGGATTCCGTT

E III
AGGCTATCGCTCACCTATCCAGATGCACACTACTTCAGAAGGTGAAAAGCCTGTGTTCTC
1501 -----+-----+-----+-----+-----+ 1560
TCCGATAGCGAGTGGATAGGTCTACGTGTGATGAAGTCTTCCACTTTTCGGACACAAGAG

AGCCTGTTCTCAGACGAGGAAGCTCTCCAACATTCTTGCTTGCAACCCTCGATCTTCTTCC
1561 -----+-----+-----+-----+-----+ 1620
TCGGACAAGAGTCTGCTCCTTCGAGAGGTTGTAAGAACGAACGTGGGAGCTAGAAGAAGG

TCTGGGTGTGAGAAGAGCAGGCCGTCAACCTCATCTTGCAAGGGCTGCTGTCTTAGGCTT
1621 -----+-----+-----+-----+-----+ 1680
AGACCCACACTCTTCTCGTCCGGCAGTGGGAGTAGAACGTTCGACGACAGAATCCGAA

TGTTCTGGGGTTGATCTTAGCAGTAGAGCTGGGAGACCGCGGAGGGGAAGAGGGCTGGCT
1681 -----+-----+-----+-----+-----+ 1740
ACAAGACCCCAACTAGAATCGTCATCTCGACCCTCTGGCGCCTCCCCTTCTCCCGACCGA

```

Figure 2-2

GGGTACTCCCCCTCCTTGCTCTTCTGGTTATTAAGCAAGAGTTGGTTTTTCAGCGGGATGAT
 1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
 CCCATGAGGGGAGGAACGAGAAGACCAATAATTCGTTCTCAACCAAAAGTCGCCCTACTA

E IV

AGGCAGTGGCCTCTGTGTGTTCTCCAAACACCCAATCCAGGAAATCTTCCAGCATGTCTA
 1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
 TCCGTCACCGGAGACACACAAGAGGTTTGTGGGTTAGGTCCTTTAGAAGGTCGTACAGAT

CAGTCTGAATGGTTACCCCTACATGGTAAGGATCTCTTCCCTATCCTTGCTAACACAGAC
 1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
 GTCAGACTTACCAATGGGGATGTACCATTCCCTAGAGAAGGGATAGGAACGATTGTGTCTG

TGGACGCAGCCTTCTCGGGCCTTGGCAGGAGGGTGTACAGTACCCTGAGTTTTTGTCTTC
 1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
 ACCTGCGTCGGAAGGACCCCGGAACCGTCTCCACAGTCATGGGACTCAAAAACAGAAG

TCTTGCTGCAGTTCATCATGGAGACTGGTTCTGTGGGAAGTCTGTGGGGCTGCTGGTG
 1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
 AGAACGGACGTCAAGGTAGTACCTCTGACCAAGACACCCTTCAGACACCCCGACGACCAC

E V

CTCCGTCTAAGTGGACTGGTGCTCAATGCCTACGTGACTCATGTGAGTGGGGCTAGCCAG
 2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
 GAGGCAGATTACCTGACCACGAGTTACGGATGCACTGAGTACACTCACCCCGATCGGTC

GCTTAGGCAGTGGGTCAAGCAGCCCAATGCTATGGTGGAGAAGAGACGCCACTAGTTAGT
 2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
 CGAATCCGTCACCCAGTTCGTCGGGTTACGATACCACCTCTTCTCTGCGGTGATCAATCA

TCTGCTGCCTGGGGATAAGGCATGGGATCAGAAGCTAGCATTGGGCAAGGTTACCCATT
 2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
 AGACGACGGACCCCTATTCCGTACCCTAGTCTTCGATCGTAACCCGTTCCAAGTGGGTAA

CCCTGTCACACTCTGCCATGTGACAGATGACAAGCTTGATTACAGACAGCCTTCTCTTTGA
 2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
 GGGACAGTGTGAGACGGTACACTGTCTACTGTTTGAAGTAAGTCTGTGCGGAAGAGAAACT

TTTCACCTATTCCACTTTAGCTACATGCTGAGTACAGCCGACAGAAGGACATCTACTTTG
 2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
 AAAGTGGATAAGGTGAAATCGATGTACGACTCATGTGCGGCTGTCTTCCTGTAGATGAAAC

E VI

CACACCGTGTGGCCCAAGCTTGGGAACTGGCCCAAGTTCATCCAGTGTGTGAGCCTGGGCT
 2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
 GTGTGGCACACCGGGTTCGAACCCTTGACCGGGTCAAGTAGGTACACACTCGGACCCGA

TGATGGGGGCTGTGGGGTGGGGACGGGGTTGAGGGATGNGNAANTTATCCTTGAAGAGGG
 2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
 ACTACCCCGACACCCACCCCTGCCCAACTCCCTACNCNTTNAATAGGAACCTTCTCCC

CACATAATAAGGGAAGAATTTCCTCCTTGCCGCTCTTCCCCCAACTCAGCCACACATCCA
 2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
 GTGTATTATTCCCTTCTTAAAGGAGGAACGCGGAGAAGGGGGTTGAGTCGGTGTGTAGGT

E VII

AGAATGCAGATGTGGTTCTATTGTGTGGAGACCTCAATATGCACCCCAAAGACCTGGGCT
 2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
 TCTTACGTCTACACCAAGATAACACACCTCTGGAGTTATACGTGGGGTTTCTGGACCCGA

Figure 2-3

GCTGCCTGCTGAAAGAGTGGACAGGGCTCCATGATGCTTTCGTTGAGACTGAGGACTTTA
 2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
 CGACGGACGACTTTCTCACCTGTCCCGAGGTACTACGAAAGCAACTCTGACTCCTGAAAT

 AGGTGAGAGACTGTTTCCCACCAACTCCACACTTGTTCAGTCTTCCTGTCTCTTAGCAT
 2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
 TCCACTCTCTGACAAAGGGTGGTTGAGGTGTGAACAAGGTCAGAAGGACAGAGAATCGTA

 CCTAGCCACCTGTTTCCCTAGGGCTCTGATGATGGCTGTACCATGGTACCCAAGAAGTGC
 2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
 GGATCGGTGGACAAAGGGATCCCGAGACTACTACCGACATGGTACCATGGGTTCTTGACG

E VIII

TACGTCAGCCAGCAGGACCTGGGACCGTTTCCGTCTGGTATCCGGATTGATTACGTGCTT
 2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
 ATGCAGTCGGTCGTCCTGGACCCTGGCAAAGGCAGACCATAGGCCTAACTAATGCACGAA

 TACAAGGTCAGGCTCTTATTCCCGGTGTGCCTTCTCCAGTATCTTCCTTCCTCTGTCACT
 2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
 ATGTTCCAGTCCGAGAATAAGGGCCACACGGAAGAGGTCATAGAAGGAAGGAGACAGTGA

 AGCCACGCTTTAGTTCAGCTACAGTCTTGGGCCACTGATGGCTAAAGAATAGAATCCTG
 2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
 TCGGGTGCAGAAATCAAGTCGATGTCAGAACCCGGTGACTACCGATTTCTTATCTTAGGAC

 TCGGCTGGTTCTCTGGGAGAATTTAAGCTTCTCCATGTTCTTGCTCTTCCTAGGCAGTCT
 2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
 AGCCGACCAAGAGACCCTCTTAAATTCGAAGAGGTACAAGAACGAGAAGGATCCGTCAGA

 CTGAGTTCCACGTCTGCTGTGAGACTCTGAAAACCACTACAGGCTGTGACCCTCACAGTG
 3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
 GACTCAAGGTGCAGACGACACTCTGAGACTTTTGGTGATGTCCGACACTGGGAGTGTAC

E IX

ACAAGCCCTTCTCTGATCACGAGGCCCTCATGGCTACTTTGTATGTGAAGCACAGCCCCC
 3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
 TGTTCGGGAAGAGACTAGTGCTCCGGGAGTACCGATGAAACATACACTTCGTGTCGGGGG

 CTCAGGAAGACCCCTGTACTGCCTGTGGTAAGCAGCATTTCCCTTTGCCCCCTCTACTTTA
 3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
 GAGTCCTTCTGGGGACATGACGGACACCATTTCGTCGTAAAGGAAACGGGGGAGATGAAAT

 AGGCAGCCCCGCTCCATCCTGACCCCTCCCCTGCTCTACGTTCTCTCTTTTCCAGGCCC
 3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
 TCCGTCGGGGCGGAGGTAGGACTGGGAGGGGACGAGATGCAAGAGAGAAAAAGGTCCGGG

 ACTGGAAAGGTCCGATTTGATCAGCGTGCTAAGGGAGGCCAGGACAGAGCTGGGGCTAGG
 3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
 TGACCTTTCCAGGCTAAACTAGTCGCACGATTCCCTCCGGTCCCTGTCTCGACCCCGATCC

E X

CATAGCTAAAGCTCGCTGGTGGGCTGCATTCTCTGGCTATGTGATCGTTTGGGGGCTGTC
 3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
 GTATCGATTTTCGAGCGACCAACCCGACGTAAGAGACCGATACTAGCAAACCCCCGACAG

 CCTTCTGGTGTGTGCTGTGTCTGCTGGCTGCAGGAGAAGAGGCCAGGGAAGTGGCCATCAT
 3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
 GGAAGACCACAACGACACACAGGACCGACGTCCTCTTCTCCGGTCCCTTCACCGGTAGTA

Figure 2-4


```

CCTCTGCATACCCAGTGTGGGTCTGGTGTGGTAGCAGGTGCAGTCTACCTCTTCCACAA
3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
GGAGACGTATGGGTACACCCAGACCACGACCATCGTCCACGTGAGATGGAGAAGGTGTT

GCAGGAGGCCAAGGGCTTATGTCGGGCCCCAGGCTGAGATGCTGCACGTTCTGACAAGGGA
3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
CGTCCTCCGGTTCCTCGAATACAGCCCGGTCCGACTCTACGACGTGCAAGACTGTTCCCT

AACGGAGACCCAGGACCGAGGCTCAGAGCCTCACCTAGCCTACTGCTTGACAGCAGGAGGG
3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
TTGCCTCTGGGTCTGGCTCCGAGTCTCGGAGTGGATCGGATGACGAACGTCGTCTCCCTCC
stop
GGACAGAGCTTAAGAGCTTAACAATAAAACTTGCTTGACACACTCTAGTGGCTCTACCTT
3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660
CCTGTCTCGAATTCTCGAATTGTTATTTTGAACGAACGTGTGTGAGATCACCGAGATGGAA

GTTCTTGACAGAGGCATGATGGGAACTGAAGGTCAGTGGCCTTGTCACGTGTGTGGCTTTA
3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720
CAAGGAACGTCTCCGTACTACCCCTTGACTTCCAGTCCCGGAACAGTGACACACCGAAAT

GAGCGTTGGCCTCTCACTTGCCCTTTTTTGCACACTCCCGTCTCCTGCCAGCACAGAGCAT
3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780
CTCGCAACCGGAGAGTGAACGGAAAAAACGTGTGAGGGCAGAGGACGGTCTGTCTCGTA

AAACCCCTGTTTCATGGTCATAATCCTTTTATTGTAAACAACGAAGCCTCTGACTAAGCAGT
3781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840
TTTGGGACAAGTACCAGTATTAGGAAAATAACATTTGTTGCTTCGGAGACTGATTTCGTCA

CCAGATGGCGGAGGTACAGCCCTTGATGGTGTCTTGCTTACGGGGCAGGGAGGCAGCT
3841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3900
GGTCTACCGCCTCCATGTCGGGAACACTACCACAGAACGAATGCCCCGTCCCTCCGTCTGA

AACCATCATCTTCTAGCCCTGGGCTCCCATCTATGCAGGCATCTCTCTGAGCCTCCGTTT
3901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3960
TTGGTAGTAGAAGATCGGGACCCGAGGGTAGATACGTCCGTAGAGAGACTCGGAGGCAAG

CTCCTGGAATTGGNTCAGAGCAATCCCGCTTGGTTACCAACCTCCAAACAGCTTCCTTA
3961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4020
GAGGACCTTAACCNAGTCTCGTTAGGGCGAACCAAGTGGTTGGAGGTTTGTCTGAAGGAAT

AGGACCTGGTTTCTCAAAANGGNAAGGTNCGGCCTCCGGTCTTCAATANGTTTTCTTAA
4021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080
TCCTGGACCAAAGAGTTTTNCCNTTCCANGCCCGGAGGCCAGAAGTTATNCAAAAGGATT

AAAGGGGANGAATGAAAANCCTTAAGNNCCAACAAGGGGAACCCCTTGGNCCCAAAAGGGGA
4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4140
TTTCCCTNCTTACTTTTNGGAATTCNNGGTGTTCCCTTGGGAACCGGGTTTTCCCTT

CCTGGGTGGTTTCCCNNTTGGGGCCAAANTTATCCCAAAGGGGTCCAATTGAAGGGTTAAC
4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4200
GGACCCACCAAAGGGNAACCCCGTTTNAATAGGGTTTCCCCAGGTAACTTCCCAATTG

CCCCCAAAAANNAACCNNTTCCCCCGGAATTTCCAAAGGTTTNNCCCCCCCCGGCAAAANC
4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4260
GGGGGTTTTTNNNTGGGNAAAGGGGGCCTTAAAGGTTTCCAAANGGGGGGGGCGTTTTNG

```

Figure 2-5


```
TCCCTTGGGGNNCCNAANCCNTGGCCCGGNCTTGGCTTTTCCCCCTTTCCCAAGNATTTTC
4261 -----+-----+-----+-----+-----+ 4320
AGGGAACCCCNNGGNTTNGGNACCGGGCCNGAACCAGAAAGGGGGAAAGGGTTCNTAAAG

AAANNTTCCCTNGGAAANCCCCCTTGNTTGGNAAAACCNAATNANGAACCANGCCAANMNT
4321 -----+-----+-----+-----+-----+ 4380
TTTNNAAGGGANCCTTTNGGGGAACNAACCNNTTTGGNTTANTNCTTGGTNCGGTNNNA

TGCCAANAAACCNNTTTGGGCAAAGGGGGNAAATTCANCAANGGGGNAATTGGGGAAACCC
4381 -----+-----+-----+-----+-----+ 4440
ACGGTTNTTTGGNAAACCGTTTCCCCCNNTTAAAGTNGTTNCCCNTTAACCCCTTTGGG

NTGGGTTTNCCCAAAGGGCCCNAANANT
4441 -----+-----+-----+-----+ 4468
NACCCAAANGGGTTTCCCGGGNTTNTNA
```

Figure 2-6

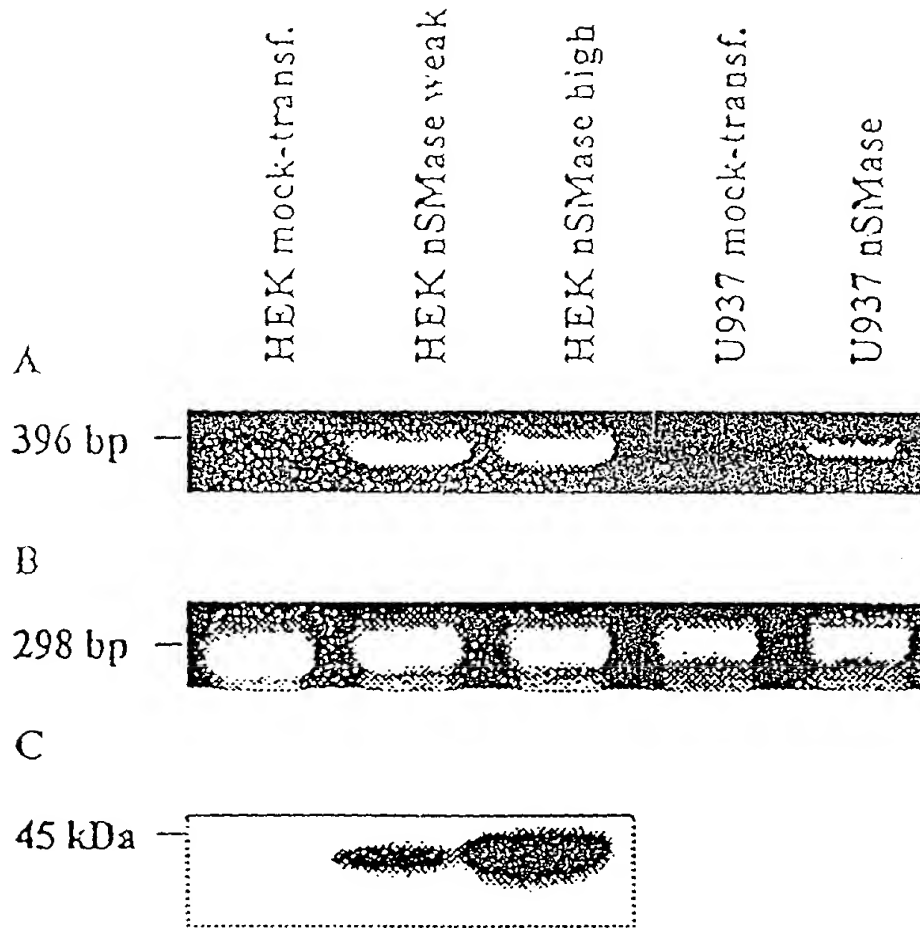
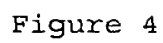


Figure 3

11 / 12



Constructs for generating transgenic mouse mutants

| | | | | |
|--------------------|--------|------|------|-------|
| ubiquitin promoter | nSMase | IRES | lacZ | polyA |
| | | | | |

| | | | | | | | |
|-------|------|-----|-------|--------|------|-----|-------|
| polyA | rtTA | CMV | CMV-1 | nSMase | IRES | GFP | polyA |
| | | | | | | | |

Ubiquitin promoter: regulatory sequence of the ubiquitin gene, controlling a ubiquitous transcription.

nSMase: neutral sphingomyelinase

lacZ: lacZ, gene coding for β -galactosidase

polyA: recognition signal for the termination of transcription and polyadenylation

CMV: cytomegalovirus promoter of the cytomegalovirus gene, controlling a ubiquitous transcription.

rtTA: reverse transactivator, binds to the minimal promoter and thus controls transcription. The binding properties of the transactivator are influenced by tetracyclin. The addition of tetracyclin makes the transactivator bind to the minimal promoter and starts transcription, removal of tetracyclin prevents the binding of the transactivator to the minimal promoter and prevents transcription.

CMV-1: minimal promoter, binding of transactivator starts transcription.

IRES: *internal ribosomal entry sequence*, viral initiation signal for translation.

Figure 5



...

...

.

..